



## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification <sup>6</sup> : C12N 1/19, 1/15, 15/80, 15/81	A1	(11) International Publication Number: WO 98/12300 (43) International Publication Date: 26 March 1998 (26.03.98)
--	----	---

(21) International Application Number: PCT/DK97/00397

(22) International Filing Date: 19 September 1997 (19.09.97)

(30) Priority Data:  
1024/96 19 September 1996 (19.09.96) DK(71) Applicant (for all designated States except US): NOVO  
NORDISK A/S [DK/DK]; Novo Allé, DK-2880 Bagsværd  
(DK).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): LEHMBECK, Jan  
[DK/DK]; Novo Nordisk a/s, Novo Allé, DK-2880  
Bagsværd (DK).(74) Common Representative: NOVO NORDISK A/S; Corporate  
Patents, Novo Allé, DK-2880 Bagsværd (DK).(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE,  
GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO,  
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,  
TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH,  
KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ,  
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE,  
CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,  
PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published

With international search report.

(54) Title: NOVEL HOST CELLS AND METHODS OF PRODUCING PROTEINS

## (57) Abstract

The present invention relates to novel host cells and to methods of producing proteins. More specifically the invention relates to a host cell useful for the expression of heterologous proteins, in which the host cell has been genetically modified in order to express significantly reduced levels of a metalloprotease and an alkaline protease. Moreover the invention relates to a method of producing a heterologous protein, which method comprises cultivating the host cell in a suitable growth medium, followed by recovery of the desired protein.

BEST AVAILABLE COPY

**\* NOTICES \***

**JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

**[Claim(s)]**

1. Said cell which is host cell useful to manifestation of different-species nature protein product, and received hereditary qualification so that METARO protease and alkaline protease activity might fall intentionally and might be discovered compared with parent cell.
2. Host cell of claim 1 said whose cell is fungus cell.
3. Host cell of claim 1 said whose cell is yeast cell.
4. Said cell is the strain of a *Saccharomyces*, and a host cell of claim 3 which is *Saccharomyces cerevisiae* (*Saccharomyces cerevisiae*) preferably.
5. Host cell of claim 2 said whose cell is yarn-like fungus.
- Said Cell 6. *Acremonium* (*Acremonium*), *Aspergillus* (*Aspergillus*), *Candida* (*Candida*), *Cochliobolus* (*Cochliobolus*), *Endothia* (*Endothia*), *Fusarium* (*Fusarium*), *HYUMIKORA* (*Humicola*), *Neurospora* (*Neurospora*), *A RIZOMU* call (*Rhizomucor*), *Rhizopus* (*Rhizopus*), *A thermostat married woman* (*Thermomyces*), *Trichoderma* (*Trichoderma*), The host cell of claim 5 which is the strain chosen from *PODOSUPORA* (*Podospora*), *Pyricularia* (*Pyricularia*), and the group of a *penicillium* (*Penicillium*) group.
- Said Cell 7. *Aspergillus NIDEYU* Lance (*Aspergillus Nidulans*), *Aspergillus AWAMORI* (*Aspergillus awamori*), *Aspergillus FENIKISU* (*Aspergillus phoenicis*), *Aspergillus JAPONIKASU* (*Aspergillus japonicus*), *Aspergillus FITASU* (*Aspergillus foetus*), *Fusarium oxy-SUPORAMU* (*Fusarium oxysporum*), *Fusarium solani* (*Fusarium solani*), *HYUMIKORA GURISEA* (*Humicola grisea*), *Neurospora KURASA* (*Neurospora crassa*), *Penicillium chrysogenum* (*Penicilliumchrysogenum*), *RIZOMU* call *MEIHEI* (*Rhizomucor meihei*), The host cell of claim 6 which is the strain chosen from *Trichoderma RESEI* (*Trichoderma reesei*) and the group of *Trichoderma viride* (*Trichoderma viride*).
8. Host cell of claim 6 said whose cell is strain chosen from groups of kind of *fusarium* group identified by *Aspergillus oryzae* (*Aspergillus oryzae*), *Aspergillus nigre* (*Aspergillus niger*), and ATCC20334.
9. Host cell of the 1st term of arbitration of claim 1-8 said whose METARO protease is METARO protease of *fusarium* group.
10. The host cell of claim 9 said whose METARO protease is p45 METARO protease of *fusarium oxy-SUPORAMU* (*Fusarium oxysporum*).
11. The host cell of claim 10 said whose METARO protease is p45 METARO protease of *fusarium oxy-SUPORAMU* which has the nucleic-acid array of the array number 1, or an array [ homologous / this ].
12. The host cell of the 1st term of the arbitration of claim 1-11 said whose METARO protease is a neutral METARO protease which shows optimum proteolysis activity by pH about six to 8 within the limits.
13. The host cell of claim 12 said whose METARO protease is a neutral METARO protease of NpI of an *Aspergillus*, or NpII(s).
14. It is the host cell of claim 13 said whose METARO protease is what has the neutral METARO protease I and the amino acid sequence which originates in the nucleic-acid array of the array number 2, or the homologous array of this preferably of *Aspergillus oryzae*.
15. The host cell of the 1st term of the arbitration of claim 1-14 said whose alkaline protease is alkaline protease of an *Aspergillus*.
16. It is the host cell of claim 15 said whose alkaline protease is that in which the code is carried out by the cDNA array including the nucleic-acid array of the array number 3, or the homologous array of this preferably.
17. The host cell of the 1st term of the arbitration of claim 1-16 with which said cell is hereditarily embellished in the structure field and regulatory region by which the code is carried out into said METARO protease and the alkaline protease gene.

18. That said cell is specific or the host cell of claim 17 hereditarily embellished by the mutation by random mutation and PCR, the deletion of a site specific DNA, insertion and/or a permutation, gene disruption or gene substitution, the antisense methods, or such combination.
19. It is the host cell of the 1st term of the arbitration of claim 1-18 which the level of a METARO protease is larger than about 50%, is preferably larger than about 85%, is preferably larger than about 90%, and falls more greatly [ it is the most desirable and ] than about 95%.
20. It is the host cell of the 1st term of the arbitration of claim 1-18 which the level of alkaline protease activity is larger than about 50%, is preferably larger than about 85%, is preferably larger than about 90%, and falls more greatly [ it is the most desirable and ] than about 95%.
21. The host cell of the 1st term of the arbitration of claim 1-18 whose fall of a METARO protease and alkaline protease activity is the combination of the arbitration of a fall shown in claims 19 or 20.
22. The host cell of the 1st term of the arbitration of claim 1-21 in which said cell does not include the METARO protease and alkaline protease activity of arbitration in essence.
23. How to produce the host cell of the 1st term of the arbitration of claim 1-22 which includes embellishing a parent cell so that a METARO protease and alkaline protease activity may fall intentionally and may be discovered compared with a parent cell.
24. How to produce the host cell of the 1st term of the arbitration including said cell being hereditarily embellished in the structure field and/or regulatory region by which the code is carried out into said METARO protease and the alkaline protease gene of claim 1-22.
25. Approach of Producing Different-Species Nature Protein Product in Host Cell of 1st Term of Arbitration of Claim 1-22 -- it is -- (a) -- Process; Which Introduces into Intracellular [ Said ] Nucleic-Acid Array Which Carries Out Code of Said Protein Product
- (b) Process which cultivates the host cell of a process (a) in a suitable growth medium;
- (c) Process which isolates said different-species nature protein product;
- Said approach of being by \*\*\*\*\*.
26. The approach of claim 25 that said protein product is a gene product with therapy activity, for example, an insulin, a growth hormone, glucagon, somatostatin, interferon, EPO and TPO, PDGF, factor VII, factor VIII, urokinase, chymosin, an organization plasminogen activator, or serum albumin.
27. The approach of claim 25 that said protein product is protein of the fungus origin.
28. The approach of claim 27 that said protein product is the enzyme of a fungus especially amylolytic enzyme, for example, the alpha-amylase, beta amylase, glucoamylase, a beta galactosidase, a cellulose-decomposing enzyme, a lipolytic enzyme, a xylan dialytic ferment, protease, an oxidoreductase, for example, a peroxidase, or a laccase, a pectinase, or KUCHINAZE.
29. The approach of claim 25 that said protein product is bacterial protein.
30. The approach of the 1st term of the arbitration of claim 25-29 that said protein product is the protein obtained as precursor protein, i.e., zymogen, hybrid protein, a pro array, or a pre pro array, or protein of other immature molds of arbitration.

---

[Translation done.]



**\* NOTICES \***

**JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**

---

**[Detailed Description of the Invention]**

A new host cell and field of protein process invention This invention relates to the process of a new fungus host cell and protein. In detail, this invention is a useful host cell in order to make different-species nature protein discover, and in order to reduce intentionally the manifestation level of a METARO protease and alkaline protease, it relates to said host cell embellished hereditarily. Furthermore, using said fungus of this invention, this invention is the approach of producing the protein of attention to high yield, and relates to said approach of changing including cultivating said host cell in a suitable culture medium, and collecting the aforementioned protein of choice continuously. Furthermore, this invention also includes the approach of creating the DNA construct used by said fungus and said approach.

Background of invention Protein with the market value can be mass-produced very easily by rearranging in the manifestation of different-species nature protein, and using a host cell recently. If this is not used, such protein must be refined and obtained from a natural material. The manifestation system for producing the protein of current and arbitration has those with varieties, for example, a bacteria host, and an eukaryote host. In many cases, selection of a suitable manifestation system not only depends on the host cell capacity to produce protein with activity with suitable yield, but may be governed very much for the purpose of [ of the protein ] the end use. This main trouble is protease of the high level which is produced by the host cell or exists in a culture medium. It is suggested that the host organism which removed the production capacity of a specific proteolysis nature compound may be offered.

For example, the yarn-like fungus host who cannot secrete the aspartic-acid proteinase which has enzyme activity is indicated by international patent application WO 90/0192 (Genencor), and the ASUPERUGIRASU group (Aspergillus) host who did deletion of the subtilisin mold serine protease is indicated by EP574 347 (Ciba Geigy AG) at it.

The METARO protease is isolated from much eukaryote. When the neutral METARO protease isolated from the ASUPERUGIRASU group, i.e., pH, is neutrality, the METARO protease which shows optimum activity is also reported. The physical chemistry property of two METARO proteases, NpI, and NpII which were isolated from Aspergillus SOJAE (Aspergillus sojae) is reported from a series of researches (Sekine, H.1972.Agric.Biol.Chem.36:198-206,207-216;Sekine, H.1972.Agric.Biol.Chem.36:2143-2150). Although the enzyme property and physical chemistry property of NpI resembled the property of the thermolysin of bacillus thermostat PUROTEORICHIKASU (Batillus thermoproteolyticus), it was shown clearly that the property of NpII did not resemble it. Recently, the cDNA array of the neutral METARO protease NpII isolated from Aspergillus oryzae (Aspergillus oryzae) was indicated (Tatsumi H, et al.1991.Mol.Gen.Genet.228:97-103). However, the cDNA array of the neutral METARO protease which belongs from A. ORIZE to NpI(s) is not indicated.

Alkaline protease is a serine protease whose optimal pH is alkalinity (Nakagawa, Y.1970.Methods Enzymol.19:581-591). This is the analog of subtilisin and is the alkaline proteinase besides main cells in A. ORIZE. This gene is isolated and the array property is clarified (Murakami, etal.1991.Agric.Biol.Chem.55:2807-2811). other two sorts, A. FURABUSU (A. flavus), and A. SOJAE of an Aspergillus -- the same enzyme -- or the enzyme of a close relationship is discovered.

The potential role of the METARO protease about reducing the stability of the protein product obtained from an ASUPERUGIRASU group and alkaline protease is not reported.

Epitome of invention In this invention, the proteolysis activity of the METARO protease I and alkaline protease is independent respectively, or combined, reduced intentionally the stability of the protein product of the attention which a cell produces, and found out that the yield of said protein might be decreased.

Therefore, this invention is a host cell useful to the manifestation of a different-species nature protein product, and offers said cell hereditarily embellished so that both the level of a METARO protease and alkaline protease might fall intentionally compared with a parent cell.

At another point, this invention is the approach of producing a different-species nature protein product in the host cell of this invention, and offers said approach of changing including introducing into said host cell the nucleic-acid array which carries out the code of said protein, cultivating said host cell in a suitable culture medium, and collecting said different-species nature protein products.

The proteinic stability and the yield which the proteolysis activity resulting from the METARO protease I and alkaline protease falls intentionally by the approach of this invention, consequently are obtained by this approach improve. Furthermore, the protein obtained as precursor protein, for example, zymogen, fusion protein, a pro array, or a pre pro array or the protein of the immature mold of other arbitration is sufficient as the protein obtained by the approach of this invention.

Easy explanation of a drawing It refers to the attached drawing and this invention is explained.

Drawing 1 shows creation of the plasmid pJaL335 which has a pyrG gene.

Drawing 2 shows creation of the plasmid pSO5 which has 5' of a pyrG gene, and 3' array.

Drawing 3 shows creation of the plasmid pJaL212 by which the pyrG coding sequence was inserted between 5' of an alp gene, and 3' array.

Drawing 4 shows creation of the plasmid pJaL399 which destroyed the coding sequence of Npl.

Drawing 5 shows the N-terminal-amino-acid array of the lipase B of Candida ANTAKUCHIKA (Candida antarctica), and the array of two oligonucleotide primers originating in this array.

Drawing 6 shows creation of the plasmid pMT1305 which has the lipase B gene of C. ANTAKUCHIKA.

Drawing 7 shows creation of the plasmid pMT1329 which has the partial array of the five prime end of the lipase B gene of C. ANTAKUCHIKA.

Drawing 8 shows creation of the plasmid pMT1332 which has the lipase B gene of C. ANTAKUCHIKA.

Drawing 9 shows creation of the manifestation plasmid pMT1335 which has the lipase B gene of C. ANTAKUCHIKA.

The detail of invention "a host cell"

This invention is a host cell useful to the manifestation of different-species nature protein, and offers said cell hereditarily embellished so that a METARO protease and alkaline protease activity level might fall intentionally compared with a parent cell. Said host cell is obtained from a parent cell, for example, a wild type cell.

The host cell of the arbitration usually used for the manifestation of different-species nature protein is sufficient as the host cell of this invention.

The host cell of this invention is the yeast or yarn-like fungus which can produce the protein to wish to have preferably. said yeast -- especially -- the stock of a Saccharomyces (Saccharomyces) -- it is preferably good at Saccharomyces cerevisiae (Saccharomyces cerevisiae). Said especially yarn-like fungus Acremonium (Acremonium), An Aspergillus (Aspergillus), Candida (Candida), Cochliobolus (Cochliobolus), en DOSHIA (Endothia), Fusarium (Fusarium), HYUMIKORA (Hulnicola), Neurospora (Neurospora), a RIZOMU call (Rhizomucor), Rhizopus (Rhizopus), a thermostat married woman (Thermomyces), It is good at the strain chosen from Trichoderma (Trichoderma), PODOSUPORA (Podospora), Pyricularia (Pyricularia), and the group of a penicillium (Penicillium) group.

Said yarn-like fungus with a desirable operation gestalt An Aspergillus NIDEYU lance (Aspergillus nidulans), Aspergillus AWAMORI (Aspergillus awamori), Aspergillus FENIKISU (Aspergillus phoenicis), Aspergillus JAPONIKASU (Aspergillus japonicus), Aspergillus FITASU (Aspergillus foetus), A fusarium GURAMINE alm (Fusarium graminearum), Fusarium oxy-SUPORAMU (Fusarium oxysporum), Fusarium solani (Fusariumsolani), fusarium BENENATAMU (Fusarium venenatum), HYUMIKORA GURISEA (Humicolagrisea), Neurospora KURASA (Neurosporacrassa), Penicillium chrysogenum (Penicillium chrysogenum), RIZOMU call . MEIHEI (Rhizomucormeihei), Trichoderma RESEI (Trichoderma reesei), And it is the strain chosen from the groups of Trichoderma viride (Trichoderma viride). Especially, it is the kind ATCC20334 of a fusarium group at the stock of Aspergillus oryzae and Aspergillus nigre (Aspergillus niger), and a list.

"METARO protease"

In this invention, a METARO protease is protease which contains a zinc metal in the catalytic center which hydrolyzes the peptide frame of a substrate. An active center is zinc and these proteases are distinguished from the calpain which has the activity depending on calcium. If 1mM 1 and 10-phenan SURORIN remove central zinc in

order to check that a protease is a METARO protease, proteolysis activity will carry out deletion reversibly, and it depends on activity being recovered if  $Zn^{2+}$  (0.1–100mM) is dropped.

this METARO protease taken into consideration in this invention with a desirable operation gestalt -- the METARO protease of a fusarium group -- it is the METARO protease of fusarium oxy-SUPORAMU (*Fusarium oxysporum*) preferably. With the most desirable operation gestalt, this METARO protease is p45 METARO protease (p45) of *F. oxy-SUPORAMU* which has the nucleotide sequence of the array number 1, or an array [ homologous / this ].

With another desirable operation gestalt, a neutral protease, i.e., optimum proteolysis activity, is neutral pH range, namely, it is the range of abbreviation pH 6–8, and this METARO protease taken into consideration in this invention is the range of abbreviation pH 6.5–7.5 preferably, and is a METARO protease especially obtained in the pH7 neighborhood. Further especially this METARO protease taken into consideration in this invention is a neutral METARO protease of the *Aspergillus* of NpI or NpII(s) (Tasutmi, et al., 1991).

With a desirable operation gestalt, this METARO protease is the neutral METARO protease I of *A. ORIZE* (NpI) which consists of an amino acid sequence originating in the nucleotide sequence of the array number 2, or an array [ homologous / this ].

“Alkaline protease”

In this invention, alkaline protease is a serine protease which has the peak of activity in alkaline pH within the limits from neutrality. From analysis of an amino acid sequence, it is pointed out that this alkaline protease is homologous at the subgroup of a subtilisin Mr. serine protease and subCHIRAZE. According to the epitome of Siezen and et al. (1991 *Protein Eng.*4:719–737), from various bacteria kinds, such as extensive various living thing kinds, a gram positive, and a gram negative, subCHIRAZE exceeding 50 covers a fungus and yeast, and the higher organism that are an insect (worms), an insect (insects), vegetation, the mammals, etc. further, and is identified.

Among these, about subCHIRAZE exceeding 40, the amino acid sequence is determined and it is shown the thing which the die length of the mature field of this enzyme has spread to 268 to 1775 amino acid, and near the amino terminal that there is a pre pro field of 27 to 280 amino acid. In a fungus and yeast, variation is clearly small, and each aforementioned fields are 279–281 and 105–121 in a fungus, and are 297–677 and 126–280 in yeast. A.

Cloning of the cDNA fragment containing the perfect coding region of this alkaline protease of the *ORIZE* origin was carried out, and it was discovered by *Saccharomyces cerevisiae* (Tasumi, H., et al.1989, *Mol.Gen.Genet.*219:33–38). This primary structure has 29 to 44% of homology to other subtilisin arrays, and 3 residue Asp33, His64, and Ser221 of the active site in subtilisin BPN' was saved.

The code of this alkaline protease is carried out with a desirable operation gestalt by the cDNA array which is alkaline protease (alp) of *A. ORIZE* and includes the nucleotide sequence or this homologous array of the array number 3 preferably.

“Sequence homology”

In the text, the homology of a DNA array is determined as same extent during two arrays, and means the origin nature from the 2nd array of the 1st array. This homology can determine appropriately by GAP (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison WI, USA; Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., 1970. *J.Mol.Biol.*48:443–453) which is in a well-known computer program, for example, a GCG program, in this industry. In the comparison of a DNA array, in GAP, a chestnut ESHON penalty is set as 5.0 and an extension penalty is set as 0.3. the coding region of a similar DNA array -- the coding region of the target DNA array -- receiving -- desirable -- at least 70% -- more -- desirable -- at least 80% -- more -- desirable -- at least 90% -- more -- desirable -- at least 95% -- and at least 97% of same extent is shown most preferably.

In the text, similarly, the homology of an amino acid sequence is determined as same extent during two arrays, and means the origin nature from the 2nd array of the 1st array. This homology can determine appropriately in this industry by the well-known computer program (Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., 1970, *supra*), for example, above GAP.

In the comparison of an amino acid sequence, in GAP, a chestnut ESHON penalty is set as 3.0 and an extension penalty is set as 0.1. the structural protein with which the target DNA array carries out the code of the polypeptide in which a similar DNA array carries out a code -- receiving -- desirable -- at least 70% -- more -- desirable -- at least 80% -- more -- desirable -- at least 90% -- more -- desirable -- at least 95% -- and at least 97% of same extent is shown especially.

This invention is turned also to the METARO protease and alkaline protease variant which have the amino acid



sequence from which, preferably three amino acid, more preferably two amino acid, and 1 amino acid is different to the mature polypeptide which has an amino acid sequence originating in the array number 1, the array number 2, and the array number 3. [ amino acid sequence ]

In the text, a similar DNA array means combining with the bottom of the specific condition explained in full detail below to the oligonucleotide probe corresponding to the polypeptide in which a code is carried out by the object DNA array containing the coding region of structural protein as hybridization.

The suitable conditions which determine the hybridization of a nucleotide probe, and Homologous DNA or an RNA array The filter containing DNA or the RNA fragment to hybridize Into 5x SSC (standard saline citrate buffer; Sambrook et al.1989, Molecular Cloning, ColdSpring Harbor NY, USA), it dips for 10 minutes beforehand, 0.5% 5 x Denhardt's solution 5 x SSC in SDS and 100microg/ml of denatured sonicated salmon sperm DNA (Sambrook et al.1989, supra) A filter is pretreated (prehybridization), And in this solution containing the 32 P-dCTP indicator probe (specific activity  $>1 \times 10^9$  cpm/mug) (Feinberg, A.P. and Vogelstein, B.1983, Anal.Biochem.132:6-13) compounded by the random primer It changes including carrying out hybridization at about 45 degrees C for 12 hours. 2 x SSC, in SDS, more preferably, it is at least 75 degrees C (the highest -- stringent) in temperature further more preferably, and at least 70 degrees C (high -- stringent) of at least 65 degrees C (the crown -- stringent) of at least 60 degrees C (stringent inside) of at least 55 degrees C (low -- stringent) of this filter are more preferably washed twice for 30 minutes 0.5%. Under these conditions, the molecule which this oligonucleotide probe hybridizes is exposed and detected to an X-ray film.

"Hereditary qualification of a host cell"

To the host cell of this invention, known standard recombinant DNA technology is used for this industry, and hereditary qualification is performed to the appearance to which the manifestation level of a METARO protease and alkaline protease activity is reduced intentionally. The gene sequence leading to each activity of a METARO protease and alkaline protease can be inactivated, or can be removed partially or completely. Therefore, the host cell of this invention discovers the METARO protease and alkaline protease which discovered the METARO protease and alkaline protease of a low or undetectable level, or were inactivated functionally.

With a specific operation gestalt, said inactivation is obtained by embellishing each structure field or control region in the METARO protease to observe and an alkaline protease gene. Although not limited to a useful technique by known, specific or the mutation by random mutation and PCR, the deletion of a site specific DNA, insertion and/or a permutation, gene disruption or gene substitution, the antisense methods, or such combination exist.

Mutation can be started using a suitable physical or chemical mutagenesis agent. Although not limited to the example of the physical or chemical mutagenesis agent suitable for the purpose of this invention, there are UV irradiation, a hydroxylamine, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), O-methyl hydroxylamine, a nitrous acid, ethylmethane sulfonate (EMS), sodium bisulfite, formic acid, and a nucleotide analog. When using these reagents, it is typically left in the mutagenesis agent which chose as the bottom of a suitable condition the cell which makes mutation induce, and mutation is attained when production of NpI and alp chooses the cell which fell intentionally.

Qualification can also be attained by setting in an accommodation element required for an imprint or translation of a structural sequence among a structural sequence, and introducing, permuting or removing one or more nucleotides. For example, by inserting or removing a nucleotide, in a structural gene, a halt codon can be introduced, an initiation codon can be removed, or an open reading frame can be changed.

According to a known approach, site specific mutation or mutation by PCR can be performed in this industry, and qualification or inactivation of a structural gene or its accommodation element can be attained. Theoretically, although you may embellish with in vivo one, embellishing with in vitro one is desirable like the following examples current.

In the selected host cell, the convenient method of inactivating a METARO protease and alkaline protease, or reducing the production is based on the approach of gene disruption. By this approach, mutation of the DNA array equivalent to the gene or gene fragment of internality to observe is carried out by in vitro ones. Consequently, this DNA array serves as a defective gene. And if this is introduced into a host cell, homologous recombination will occur and this defective gene will replace the gene or gene fragment of internality. Also as for the marker used in order that each gene which carries out the code of a METARO protease and/or the alkaline protease may choose as this defective gene or a defective gene fragment the transformant embellished or destroyed, it is desirable to carry out the code.

The approach of making carry out deletion of the target gene, or destroying Especially Miller, et al(1985

Mol.Cell.Biol.5:1714-1721);WO 90/00192, May, G. (1992) [ Applied Molecular Genetics of Filamentous ] Fungi.J.R.Kinghorn and G. Turner, eds., and Blackie Academic and Professional, pp.1-25; and Turner, G. (1994) [ Vectors for Genetic Manipulation.S.D.Martinelli ] It is indicated by and J.R.Kinghorn, eds., Elsevier, and pp.641-665.

Or according to the established antisense method, qualification or inactivation of this DNA array can be attained using a complementary nucleotide sequence to the nucleotide sequence of the coding sequence 1 of a METARO protease, for example, an array number, and the array number 2 or the coding sequence of alkaline protease, for example, the nucleotide sequence of the array number 4. The antisense method and its application are indicated by U.S.Patent No.5,190,931 (University of New York) at the detail.

By such hereditary qualification, the host cell of this invention discovers the METARO protease and alkaline protease activity of a low intentionally. With a desirable operation gestalt, respectively, such proteolysis activity level which this host cell has discovered is larger than about 50%, preferably larger than about 85%, is most preferably [ it is more desirable, and is larger than about 90%, and ] larger than about 95%, and falls. In another desirable operation gestalt, such proteolysis activity may fall in the combination of arbitration in the host cell of this invention. There is essentially no decomposition activity which originates in a METARO protease and alkaline protease in the manifestation product of this host cell with the most desirable operation gestalt.

"A proteinic process"

If the approach of this invention is used, since the proteolysis activity of a METARO protease and alkaline protease will fall intentionally, the stability of the protein product which is [ which the host cell of this invention compounds ] easy to be influenced improves, and the yield increases. In detail, this host cell is hereditarily embellished using the approach of this invention in the structure field by which the code is carried out into the METARO protease and the alkaline protease gene, and/or a control region.

Therefore, another point of this invention is offering said approach of changing in the host cell of this invention including introducing into said host cell the nucleic-acid array which carries out the code of the protein product \*\*\*\*\* (ed) and observed, cultivating the host cell in a suitable culture medium, and collecting the protein products by the approach of producing protein, such as a different-species nature polypeptide.

Therefore, the host cell of this invention must have the structural gene field required for a manifestation and regulatory gene field of the product to wish to have. It depends for the property of such a structure field and a control region on a product and a host cell in question greatly. This contractor can succeed in the hereditary design of the host cell of this invention using the standard recombinant DNA technology about the transformation or transfection of a host cell (Sambrook et al.).

The suitable cloning medium containing the DNA fragment which carries out the code of the protein product preferably expected of this industry using a known approach, i.e., a plasmid, and a vector are introduced, and this host cell is embellished.

This cloning medium can be introduced into this host cell, or can be made to build into that chromosome as a plasmid to replicate autonomously. Preferably, this cloning medium has one or more structure fields connected with one or more suitable control regions possible [ an operation ].

This structure field is a field of the nucleic-acid array which carries out the code of the protein product to wish to have. With this control region, promoter region including a transcriptional control array and a translational control array, the halt field containing a halt signal, and the polyadenylation field are included. The nucleotide sequence which demonstrates transcriptional activity in this promotor, i.e., the selected host cell, can be preferably acquired from the outside of a cell or intracellular protein, and the gene that carries out the code of an enzyme, for example, an amylase, glucoamylase, a protease, lipase, a cellulase, xylanase, oxidoreductase, a pectinase, KUCHINAZE, or the glycolytic pathway enzyme. For the example of the promotor suitable for the imprint in a fungus host cell A. The TAKA amylase of ORIZE, neutral alpha-amylase of A. nigre, A. The acid stability alpha-amylase of nigre, A. nigre, or glucoamylase of A. AWAMUSHI (*Aspergillus awamori*) (GluA), A. The aceto amidase of a NIDEYU lance, alkaline protease of A. ORIZE, A. There is a promotor obtained from the gene which carries out the code of the triosephosphate isomerase of ORIZE, the aspartic-acid proteinase of R. MEIHEI (*Rhizopus meihei*), and the lipase of R. MEIHEI. Desirable promoters are the TAKA amylase of A. ORIZE, and the thing of GluA of A. AWAMUSHI.

Furthermore, this cloning medium may also contain the gene of the product which complements the deficit of a selective marker, for example, this host cell, or the gene of the product which gives antibiotic resistance. There are hygromycin, FIREO mycin (phleomycin), and a buster (basta) in an antibiotic useful to selection of an



Aspèrgillus: argB which carries out the code of the enzyme which participates in the biosynthesis of a pyrG; arginine which otherwise carries out the code of the enzyme which participates in use of an acetamide to the example of the selective marker used for an Aspergillus, and which carries out the code of the enzyme which participates in the biosynthesis of an amdS; uridine; sC, \*\*\*\*\* which carry out the code of the enzyme which participates in the anabolic pathway of the niaD; and the sulfate which carry out the code of the enzyme which participates in the anabolic pathway of a nitrate. Furthermore, you may choose by joint transformation (co-transformation), namely, a transformation is carried out by the mixed liquor of two vectors, and selection is performed only to one vector among those.

The approach of inserting them in the approach of connecting each of the element of the DNA construct of this invention, a promotor, a terminator, and others and a suitable cloning medium including information required for a duplicate is common knowledge at this industry (Sambrook et al., 1989).

The culture medium used in order to cultivate the host cell of this invention may be the suitable usual culture medium of arbitration, and can be prepared according to the principle of the conventional technique. Other mineral salt is preferably included in this culture medium at a carbon source and a nitrogen source, and a list. Suitable culture medium, for example, the minimal medium, or a complex medium can also be prepared according to the presentations (The Catalogue of Strains, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA1970, etc.) which receive from a company or are released.

In many cases, it will depend for pH suitable for fermentation on factors, such as a property of the host cell to be used, a presentation of a growth medium, and the stability of the target polypeptide. Therefore, in pH of arbitration, although the host cell of this invention may be cultivated using the fermentation process of arbitration, in pH which the acidity of this host cell and/or neutral protease activity are essentially lost, or falls intentionally at least, fermenting is advantageous. Although aspartic protease activity may be abolished by raising pH of fermentation like the publication of WO 90/00192, there is no advantageous effectiveness to the yield of the protein of choice obtained from the host cell cultivated in alkaline pH range.

The activity of acid protease, for example, aspartic protease, and a serine protease falls, or is checked, and the activity of a neutral protease falls or will be checked, when pH range is still higher than 7, when pH of a fermentation process is within the limits of 5-11, for example, within the limits of 6-10.5, 7-10, or 8-9.5.

There are a glucanase, a phytase, and protein disulfide isomerase in the example of the enzyme fermented and produced under alkali conditions.

However, under alkaline pH conditions, by the host cell which is not embellished, alkaline protease activity is maintained, consequently disassembly of the purpose polypeptide product will break out potentially. Therefore, it is especially advantageous to inactivate the gene which carries out the code of the alkaline protease in such a case. Since acidity, neutrality, and alkaline protease activity level change for every cell strain, in a certain host cell, especially inactivation of the alkaline protease gene of this invention is advantageous. For example, the alkaline protease activity level of A. ORIZE is higher than the thing of A. nigrè.

The protein to wish to have is collected from culture medium according to the usual protein isolating method and a usual purification method after culture. Chromatography methods, such as precipitating the protein component of culture medium and an ion exchange chromatography, gel filtration chromatography, and affinity chromatography, are contained in the established purification approach by salts, such as separating a cell from culture medium by centrifugal or filtration; and an ammonium sulfate.

#### "Product"

It is good at the eukaryote nature, the bacterial protein, or the peptide of arbitration, the end product, i.e., the different-species nature protein, of the hope discovered by the host cell of this invention.

about the regulatory sequence of a proper required for the manifestation of the proper protein embellished with the text so that the array of the protein or the polypeptide which is not peculiar to a host cell as for "different-species nature protein", and a proper might be changed, or proper protein, for example, a promotor, and a ribosome bond part -- etc. -- as a result of operating it or operating a host cell by recombinant DNA technology, the proper protein from which the amount of manifestations changed is meant.

The peptide with which this product has therapy activity with a more specific operation gestalt or protein, for example, hormone, especially an insulin, a growth hormone, glucagon or somatostatin; interleukin, an interferon; hematopoietic cell growth factor especially a platelet derived growth factor (PDGF), erythropoietin (EPO), or thrombopoietin (TPO); they are protease especially factor VII, factor VIII, urokinase, chymosin, or organization plasminogen activator; or serum albumin.

With another desirable operation gestalt, this product is the enzyme of a fungus or the bacteria origin. Preferably said enzyme A glycosidase enzyme, for example, an amylase, Especially, alpha-amylase (EC 3.2.1.1) or beta-amylase (EC 3.2.1.2); Glucan 1, 4-alpha-glucosidase (EC.3.2.1.3), a cellulase, especially endo-1,4-beta-glucanase (EC.3.2.1.4) -- or -- and -1 and 3(4)-beta-glucanase (EC 3.2.1.6); xylanase -- Especially End -1, 4-beta-xylanase (EC 3.2.1.8), or xylan - and -1, 3-beta-xylosidase (EC 3.2.1.32); polygalacturonase (EC 3.2.1.15); glucosidase, Especially, alpha-glucosidase (EC 3.2.1.20) or beta-glucosidase (EC 3.2.1.21); Galactosidase, Especially Alpha-galactosidase (EC 3.2.1.22) or beta-galactosidase (EC 3.2.1.23); and a glucanase, Especially An end -1, a 3-beta-glucanase (EC 3.2.1.39), And -1, a 3-alpha-glucanase (EC 3.2.1.59) and -1, a 2-beta-glucanase (EC 3.2.1.71), Or they are an end -1, 6-beta-glucanase (EC 3.2.1.75); and a cellulose -1, and 4-beta-cello BIOSHIDAZE (EC 3.2.1.91).

With another desirable operation gestalt, said enzyme is a lipolytic enzyme especially lipase, esterase, phospholipase, or the lysophospholipase.

With another desirable operation gestalt, said enzyme is a phytase especially 3-phytase (EC3.1.3.8), or the 6-phytase (EC3.1.3.26).

With another desirable operation gestalt, said enzyme is protease.

With another desirable operation gestalt, said enzyme is a laccase, a pectinase, KUCHINAZE, or oxidoreductase, for example, a peroxidase.

another desirable operation gestalt -- this product -- a hybrid polypeptide -- they are the prochymosin and a protrypsin Mr. protease preferably.

Since a METARO protease and alkaline protease activity suffer a loss, the protein obtained as precursor protein, for example, zymogen, hybrid protein, a pro array, or a pre pro array or the protein of the immature mold of other arbitration is sufficient as this different-species nature protein discovered by this host cell.

Example It refers to the following examples and this invention is explained further. These examples do not limit the range of this invention.

An ingredient and an approach "strain"

*Aspergillus oryzae* IFO4177: Available from Institute for Fermentation, Osaka (Institute for Fermentation) (2-17-15, Jusohommachi, Yodogawa-ku, Osaka-shi).

*Fusarium oxy-SUPORAMU* DSM 2672: Finishing [ Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH / (Mascheroder Weg 1b, DE-3300 Braunschweig, Germany) / (DSM) / deposition June 6, 1983 ] according to a swine plague treaty.

HowB101: Creation of this stock is indicated by the example 1.

JaL125 : Creation of this stock is indicated by the example 1.

JaL151 : Creation of this stock is indicated by the example 1.

JaL228 : Creation of this stock is indicated by the example 1.

"Gene"

alp : This gene carries out the code of the alkaline protease shown in the array number 3.

Npl : This gene carries out the code of the neutral METARO protease I shown in the array number 2.

pyrG: This gene carries out the code of the enzyme and orotidine-5'-phosphoric-acid decarboxylase which participate in a uridine biosynthesis.

p45 : This gene carries out the code of the neutral METARO protease I shown in the array number 1.

"Plasmid" <BR> pSO2 : This preparation is indicated by the example 1.

pSO5 : This preparation is indicated by the example 1.

pSRe403: This preparation is indicated by the example 1.

pSRe403 deltaSacII: This preparation is indicated by the example 1.

pJaL173: This preparation is indicated by the example 1.

pJaL212: This preparation is indicated by the example 1.

pJaL335: This preparation is indicated by the example 1.

pJaL389: This preparation is indicated by the example 1.

pJaL399: This preparation is indicated by the example 1.

pToC65: This preparation is indicated by EP531 372B.

pToC68: This preparation is indicated by WO 91/17243.

pToC90: It is the subclone (Corrick et al., 1987, and GENE 53:63-71) of p3SR2 which contains the amdS gene of an *Aspergillus NIDEYU* lance as a XbaI fragment of 2.7kbs on the pUC19 vector (Yannisch-Perron et al., 1985, and

GENE 33:103-119), and this preparation is indicated by WO 91/17243.

pDM115 : This preparation is indicated by the example 1.

pMT1303 : This preparation is indicated by the example 2.

pMT1305 : This preparation is indicated by the example 2.

pMT1329 : This preparation is indicated by the example 2.

pMT1330 : This preparation is indicated by the example 2.

pMT1332 : This preparation is indicated by the example 2.

pMT1335 : This preparation is indicated by the example 2.

"The activity measurement method of protease"

METARO protease activity is 0.1M Tris and 2mM beforehand. In CaCl<sub>2</sub> and pH7, after mixing with a trypsin for 30 to 60 minutes at 25 degrees C, it measures as reduction of the trypsin activity (in the range where pH is lower, the buffer solution which consists of a 100mM borate, 10mM DMG, and 2mM CaCl<sub>2</sub> is used). Trypsin activity was measured on the microtiter plate. Sample 100ml is mixed to a 100ml L-BAPNA substrate (what diluted the preservation liquid (Sigma Aldrich Corp., St.LouisMO, USA) of 87mg/[ml DMSO] with the buffer solution 50 times), and the absorbance of 405nm is measured by ThermoLax microplate reader (Molecular Devices Corp., Sunnyvale CA, USA).

Alkaline protease activity is measured at 25 degrees C in 1ml (20 mM Tris-HCl) of reaction mixture using synthetic substrate N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide (Sigma Aldrich Corp.) 1mM. Isolation of para-nitroaniline is measured by 410nm (85 Ramesh, MV, et al., Infection and Immunity62:79- 1994).

Example 1 "the genome deficit of the alkaline protease (alp) gene of *Aspergillus oryzae*, and the neutral METARO protease I (NpI) gene of *Aspergillus oryzae*"

A. Use the pyrG gene of A. ORIZE as a selective marker in the pyrG-stock of ORIZE. A single step gene substitution method is performed twice continuously. An alp gene and a NpI gene Deletion is carried out respectively (). [ Miller, B.L., ] [ et ] al., 1985, and Mol.and Cell.Biol.5:1714-1721 and and May and G.in Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi, pp.1-25.J.R.Kinghorn and G.Thrner, eds.;Blackie Academic and Professional, 1992.

"A. cloning of the pyrG gene of ORIZE"

A. The pyrG gene of nigre was made to hybridize and the pyrG gene of A. ORIZE was cloned (van Hartingsveldt, W., etal., 1987, Mol.Gen.Genet.206:71-75). the lambda phage library created from DNA of A. ORIZE IFO4177 which carried out partial cutting by Sau3A -- 1kb of the pyrG gene origin of A. nigre a DNA fragment -- a probe -- carrying out -- low -- it screened under the stringent condition. Subcloning of the DNA of one electropositive clone was carried out to pUC118 vector. A. It was \*\* carried out of said pyrG gene being contained in the made plasmid pSO2 from the complement to the pyrG variant of nigre.

"Creation of the pyrG plasmid pJaL335"

A. The 431bp fragment located in upper 479 nucleotide of the five prime end of the pyrG coding sequence of ORIZE was amplified by PCR using the following two primers.

Primer A: 5'-GGAGGAAGATCTCTCTGGTACTCTTCGATCTC-3' (array number 4)

Primer B: 5'-GGAGGAGAATTCAAGCTTCTTCTACATCACAGTTTGAAAGC-3' (array number

5)

An underline field shows the array which exists in 5' field of the pyrG gene of A. ORIZE. The limit part was inserted in the five prime end part of each primer. In Primer A, Primer B includes an EcoRI part for a BglII part next to a HindIII limit part.

The plasmid pSO2 was used as mold of an PCR reaction. a reaction condition -- the inside of 100micro (50mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>) of reaction buffer solutions I -- Taq polymerase 2.5 unit, pSO2 1000ng, and every -- dNTP 250nM and said each primer 10pmol were contained.

Using Perkin-Elmer Centus DNA Thermal 480, a magnification reaction makes 1 cycle for [ 94 degrees-C ] 1 minute, for [ 55 degrees-C ] 30 seconds, and for [ 72 degrees-C ] 1 minute after a reaction for 94-degree-C 3 minutes, and is 25 cycle \*\*\*\*\*. By this PCR, the single DNA fragment of die-length 430bp generated. After BglII and EcoRI cut this fragment, it dissociated and refined by gel electrophoresis, it cloned to the BglII/EcoRI part of a plasmid pSO2, and the plasmid pJaL335 was created. Therefore, pJaL335 has the pyrG gene pinched by two 431bp fragments. Drawing 1 shows the creation process of pJaL335.

"Creation of the pyrG deficit plasmid pSO5"

After cutting the plasmid pSO2 by NheI and removing the coding sequence of about 1.1 kbs of a pyrG gene, it re-



connected and the pyrG deficit plasmid pSO5 was created. The furan king array of one kb each by the side of 5' the side and 3' of a pyrG gene remains in this. This creation is shown in drawing 2.

"A. creation of the pyrG-stock HowB101 of ORIZE"

The transformation of A. ORIZE IFO4177 was carried out with the 2.2kbHindIII fragment including 5' side and 3' side furan king array of the pyrG gene of A. ORIZE acquired from pSO5. In order to choose a pyrG variant, the transformant was chosen by the phenotype of 5-fluoro orotic-acid resistance. It turned out that one variant HowB101 has the deficit expected from the locus of pyrG of A. ORIZE by the Southern analysis. Since HowB101 is a uridine dependency, the stock in which the transformation was carried out by the wild type pyrG gene can be chosen by the growth ability under uridine nonexistence.

"Creation of the alp genetic defect plasmid pJaL212"

The genomic DNA library was created from DNA of A. ORIZE IFO4177 which carried out partial cutting by Sau3A. These fragments were connected with pUC19 cut by BamHI. A. With the complementary degeneracy oligonucleotide probe, this library was screened in the known protein array fragment of the alkaline protease of ORIZE. Consequently, the plasmid pSRe403 containing the Sau3A fragment of 3.9kb was obtained.

After cutting pSRe403 by SacII, the plasmid from which about 1 kb fragment of an alp gene was removed was made by re-connecting. This was set to pSRe403deltaSacII.

HindIII cut pSRe403deltaSacII partially and this end was graduated by the Klenow polymerase. Then, this was re-connected and the HindIII part within pUC19 array was removed. The made plasmid was set to pJaL173.

pSO2 was cut by HindIII and the 3.8kb fragment containing a pyrG gene was obtained. This fragment was inserted in the HindIII part of pJaL173, and the plasmid pJaL212 was made. In this plasmid, the pyrG gene HindIII fragment is respectively inserted into 5' of an alp gene, and 3' array on that upstream and lower stream of a river.

"A. creation of the alp-stock JaL125 of ORIZE"

With the SacI/SphI fragment of 6.8kbs obtained from pJaL212, the transformation of HowB101 was carried out by the standard approach. This fragment consists of 3' terminator 1.5kb of promotor 1.5kb of alp, a pyrG gene, and an alp gene. This transformant was chosen by the growth ability under uridine nonexistence.

The radioactive indicator of the PstI/SacII fragment of 599bp(s) containing an alp gene part obtained from pJaL173 was carried out, Southern blotting was performed by having made this into the probe, and these transformants were analyzed. With the wild type, the PstI band of 1.0kbs chose the transformant by shifting to 1.9kb on the stock which has the deficit of an alp gene. Such four transformants were identified and one of pieces of this was set to JaL125.

"A. cloning of the NpI gene of ORIZE"

The cosmid library of A. ORIZE was created using SuperCosI Cosmid Vector Kit (Stratagene, Inc., La Jolla, CA, USA) as the description.

A. The genomic DNA of ORIZE IFO4177 was prepared from the protoplast isolated by the standard approach (Christensen, T., et al., 1988, Biotechnology 6:1419-1422). After isolating, by Labufuge T (Heto), the at-long-intervals alignment was carried out by 2500rpm for 5 minutes, and the protoplast was settled. This pellet was \*\*\*\* (ed) in the buffer solution (10mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA), and this was processed by the 100microg [/ml] protease K and 0.5% SDS. This process for DNA preparation and all the following processes were performed according to the recommended practice of SuperCosI Cosmid Vector Kit.

Electrophoresis was performed using the gel equipment (BioRad, Hercules, CA, USA) of CHEF, and the size of genomic DNA was analyzed. Simply, it carried out on condition that 200 volts and a 10 to 50-second pulse for 20 hours using agarose gel 1%. When ECHIJIN star's picture dyeing of the gel was carried out and a photograph was taken under UV irradiation, the length was accepted for DNA of the range of 50 to 100 or more kbs. Partial cutting of this DNA was carried out by Sau3A. The size of the obtained DNA fragment was the range from CHEF gel analysis to 20 to 50kbs.

PAKKEJINGU [ the SuperCosI vector was prepared and connected from the band formed in cesium chloride inclination, and ] according to the approach of said kit. After determining the potency of this library, transfection of all the PAKKEJINGU mixed liquor obtained from one connection and PAKKEJINGU was carried out to host cell XLI-BlueMR of said kit. This was wound around LB plate containing 50microg [/ml] ampicillin. About 3800 colonies were obtained. When the cosmid prepared from ten colonies was analyzed, the insertion sequence of the size expected from the all was accepted. The colony was taken up according to the individual, the microtiter plate of 96 wells containing LB (100microg [/ml] ampicillin content) of 100microper well I was inoculated, and this was cultivated at 37 degrees C overnight. 50% glycerol 100microl -- each -- in addition to the well, all libraries were

frozen at -80 degrees C. 3822 colonies were saved in all. It means that, as for this, the genome of A. ORIZE was amplified about 4.4 times.

"Preparation of the probe of p45 METARO protease of fusarium oxy-SUPORAMU"

Cloning of the p45 METARO protease gene of fusarium oxy-SUPORAMU was carried out as indicated by WO 95/30757 (Novo Nordisk Biotech, Inc., and published 16 November 1995).

One clone chosen from the cDNA library was set to pDM115. pDM115 prepared the probe from this plasmid including the cDNA fragment of 1.76kbs which carry out the code of the p45 gene part of F. oxy-SUPORAMU. This plasmid was cut by SalI and this fragment was separated by agarose gel 1%. The DNA fragment was extracted from the observed 1.5kb band. The indicator of this fragment was carried out by 32 P-dATP using the random primer, and it was used as a probe for the Southern analysis and screening of A. ORIZE cosmid library of this.

"A. screening of an ORIZE library"

F. With p45 probe of oxy-SUPORAMU, in order to screen A. ORIZE cosmid library, on LB plate (100microg [/ml ] ampicillin content), 96 well, the instrument of 6 train 8 pin for plates was used, and the freezing colony according to individual of this library was inoculated. All plates including all the colonies of a library were cultivated at 37 degrees C overnight. The sterilization filter paper (Whatman 540) turned off in the magnitude of a plate was carried on the colony, and it cultivated at 37 degrees C for further 2 hours. By 0.5MNaOH, for 5 minutes, it washed by 0.5 M Tris-HCl (pH.4) to the degree, and 2x SSC washed the next day and its filter paper for 5 minutes at the last twice for 5 minutes. This filter paper was attached to ethanol and dried in air.

This filter paper was hybridized using 32P indicator DNA fragment of 1.5kbs obtained from pDM115. Hybridization was performed for 65-degree-C 16 hours in the hybridization buffer solution (10 x Denhart's solution, 5x SSC, 0.02M EDTA, 1% SDS, 0.15mg/ml polyA-RNA & 0.05mg/ml yeast RNA). After hybridization, this filter paper was washed twice at 2x SSC, 0.1%SDS, and 65 degrees C, and was exposed on X-line film. Three colonies hybridized to this probe (three E8, 3C1, 2 A5).

"The property of said cosmid clone"

From restriction enzyme analysis, two insertion sequences originating in the same field of the genome of A. ORIZE were included in three E8 and 3C1 among said three cosmid clones. Cosmid DNA 3microg was cut by EcoRI, and fractionation was carried out by agarose gel electrophoresis. The DNA was imprinted to the Immobilon-N millipore filter (Millipore), and was hybridized using pDM115 probe which carried out the radioactive indicator to it.

Consequently, the EcoRI fragment of 4kb hybridized in both the cosmid clone. The EcoRI fragment of these 4kbs was analyzed further.

"Creation of the NpI deficit plasmid pJaL399"

The plasmid pToC65 currently indicated by EP531 372 was cut by SacI, and in order to remove the phosphoric-acid radical of a five prime end, by the bacterial alkaline phosphatase (Boehringer Mannheim), the phenol extract was processed and carried out and it precipitated. The SacI fragment of 5.5kbs containing the NpI gene of A. ORIZE obtained from the cosmid clone three E8 was isolated and refined by gel electrophoresis. The two aforementioned fragments were mixed and connected. After carrying out the transformation of the Escherichia coli by this, restriction enzyme analysis of the prepared plasmid was performed and the Escherichia coli colony which has a suitable plasmid was identified. The obtained plasmid was set to pJaL389. Np of the DNA array analysis of this subclone part to A. ORIZE -- it was and existence of the coding region of a gene was checked.

The plasmid pJaL389 was cut by BclI and the 1.1kb fragment inside a NpI gene was removed.

The Klenow polymerase processing of the remaining 7.1kb fragments was carried out, the end was graduated, and it dissociated and refined by gel electrophoresis. Next, bacterial alkaline-phosphatase processing of this DNA fragment was carried out, and the phenol extract was carried out and it precipitated. The plasmid pJaL335 was cut by HindIII and the 3.5kb fragment containing the pyrG gene of A. ORIZE was obtained. The two aforementioned fragments were mixed and connected. After carrying out the transformation of the Escherichia coli by this, restriction enzyme analysis of the prepared plasmid was performed and the Escherichia coli colony which has a suitable plasmid was identified. Creation of this plasmid pJaL399 is shown in drawing 4.

Therefore, a plasmid pJaL399 permutes the BclI fragment of 1.1kbs inside the NpI gene in pToC65 vector in the 3.5kbDNA fragment which carries out the code of the pyrG gene of A. ORIZE.

"A. isolation of the pyrG-stock JaL151 of ORIZE"

A. The alp-stock JaL125 of ORIZE was screened and the pyrG variant which became 5-fluoro orotic-acid resistance spontaneously was identified. This one stock JaL151 checked that they were alp- and pyrG-. Like HowB101, since JaL151 is a uridine dependency, it can choose the stock in which the transformation was carried



out by the wild type pyrG gene by the growth ability under uridine nonexistence.

#### "A. creation of the NpI-stock JaL228 of ORIZE"

By the standard approach, the transformation of JaL151 was carried out with the SacI fragment of 7.9kbs of pJaL399. This transformant was chosen by the growth ability under uridine nonexistence. After choosing again, Chromosome DNA was prepared from the 12 transformant. What cut DNA of each transformant by BclI was analyzed by Southern blotting by using as a probe what carried out <sup>32</sup>P indicator of the SacI fragment of 5.5kbs containing a NpI gene obtained from pJaL389. The target stock was identified when the mobility of that the band of the BglI fragment of 1.1kb does not appear after hybridization (destruction of a NpI gene is meant), 5', and 3' furan king array changed. One stock in these transformants was set to JaL228.

#### Example 2 "C. cloning of the lipase B of ANTAKUCHIKA"

Partial cutting of the genome of Candida ANTAKUCHIKA was carried out by Sau3A, and the genomic library was prepared using pBR322. The duplicate filter was screened by two oligonucleotide probes designed from the N-terminal-amino-acid array of CLB (C. antarctica lipase B), and NOR929 (array number 4) and NOR930 (array number 5) ( drawing 5 ). Eight colonies were identified. Duplication of an insertion sequence was accepted from plasmid analysis. 7. The plasmid pMT1303 including the insertion sequence of 8kb was analyzed further. The plasmid pMT1305 which has the insertion sequence of 2.1kb except for a Sall fragment from there was created ( drawing 6 ). It checked that determined the array of pMT1305 and the code of the CLB was carried out by making NOR929 into a primer. Using Promega Erase-a-Base system (Promega Corp., Madison WI, USA), the continuous deletion array was created from pMT1305, and the gene sequence of the overall length of both strands was determined. The coding sequence is shown in the array number 6.

#### "-- partial -- creation" of the plasmid pMT1329 containing CLB

The Sall/HindIII fragment of 788bp(s) which carry out the code of the amino terminal array of CLB was isolated from pMT1305. Two HindIII/BanI fragments of smallness fragment 170bp and the Bani/Sau3A fragment (the Sau3A end was graduated) of 204bp(s) were isolated from this fragment. These two fragments were cloned to plasmid pIC19R cut by EcoRV/HindIII. By this, in the location of 9bp next door of the initiation codon of CLB, Sau3A and EcoRV which were graduated connected and it became a BglI part. This plasmid was set to pMT1329 ( drawing 7 ).

#### "-- partial -- creation" of the plasmid pMT1332 containing CLB

The HindIII/XmnI fragment of 670bp(s) which carry out the code of the C terminal array of CLB was isolated from pMT1305, and it cloned to the plasmid pIC7 cut by HindIII/NruI. This was set to pMT1330. The HindIII/NarI fragment of 3.0kbs from pMT1329 and the HindIII/ClaI fragment of 0.7kbs from pMT1330 were connected, and the plasmid pMT1332 in which the perfect gene of CLB was made to form was created ( drawing 8 ).

#### "Creation of the CLB manifestation plasmid pMT1335"

The clb gene was made to discover in an ASUPERUGIRASU group using an expression vector pToC68. The BclI/BglII fragment of 1kb from pMT1332 was inserted in pToC68 cut by BamHI, and pMT1335 was created ( drawing 9 ). The plasmid pMT1335 was created as a vector for making the lipase B of C. ANTAKUCHIKA discover in a fungus.

#### "A. a manifestation of the lipase B of C. ANTAKUCHIKA in an ORIZE stock"

By two plasmids, pMT1335 and pToC90, joint transformation of the A. ORIZE stocks IFO4177 and JaL228 was carried out respectively.

The transformant was chosen with the proliferation potential in the inside of the minimal medium of 10mM acetamide content, and the transformant which contained pMT1335 by the productivity of CLB was chosen further. A. One piece was respectively chosen from the transformant of the wild strain IFO4177 of ORIZE and alp-, and the NpI-stock JaL228, and tank fermentation was carried out for 93 hours. The conidium was inoculated into the Keiler fermenter (2L) containing the mixed liquor of 20% maltose liquid and 8% urea of 1.2L. The mixed liquor of maltose liquid and 8% urea was supplied continuously 20%. The phosphoric acid required in order to maintain pH to 7 was added.

In following Table 1, the yield of the CLB activity in JaL228 and the yield in IFO4177 were measured. One lipase unit (LU) is defined as the amount of enzymes required in order to separate the butyl acid of 1micromol in 1 minute after the tributyrin by the bottom of pH7.0 and 30-degree C conditions here. When it turns out many [ as the volume of IFO4177 / the volume in JaL228 / 1.8 times ] and deletion of an alp gene and the NpI gene was carried out from this table, it was proved that the stability of the protein which is easy to be cut in such protease activity can be raised intentionally.



The CLB vblume by IFO4177 and JaL228 after table 193-hour tank fermentation

時間	IFO4177(LU/g)	JaL228(LU/g)
93	575	1041

## 配列表

## (1) 一般情報:

(ii) 発明の名称: 新規な宿主細胞およびタンパク質生産方法

(iii) 配列の数: 6

## (2) 配列番号1の情報:

## (i) 配列特性:

(A) 長さ: 2052塩基対

(B) 型: 核酸

(C) スtrand: 1本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(ii) 分子型: ゲノムDNA

## (vi) 起源:

(A) 生物: *Fusarium oxysporum*

(B) 株: DSM2672

(C) 単離体: p45

## (ix) 特徴:

(A) 名称/キー: mat ペプチド

(B) 位置: 785..2049

## (ix) 特徴:

(A) 名称/キー: sig ペプチド

(B) 位置: 55..784

## (ix) 特徴:

(A) 名称/キー: インترون

(B) 位置: 364..415

## (ix) 特徴:

(A) 名称/キー: インترون

(B) 位置: 802..854

(1x) 特徴 :

(A) 名称 / キー : イントロン

(B) 位置 : 1821..1868

(xi) 配列記載 : 配列番号 1 :

ATGCGTTTCT CCGACTCTCT CCTCCTCATC GGCCTATCCA GCCTCGCTGG TGCTCATCCC	60
AGCAGAAGGG CTCCTAATCC TTCACCGCTG AGCAAGCGTG GCCTCGACCT GGAAGCTTTT	120
AAGCTTCTCT CCATGGCCGA GTACGTTCTT CAGGACGAGG TTCCTGATGA TGTCAGTGCC	180
AAGGTCGTCA CCAAGCGCGC TGATTACACC GAGACTGCCA AGGACTTGGT TAAGTCGACT	240
TTCCCCAAGG CTACTTTCCG TATGGTCACG GATCACTATG TTGGTAGCAA CGGAATTGCG	300
CATGTAAACT TTAAGCAGAC TGTCAACGGT ATTGATATCG ACAATGCTGA TTTCAACGTC	360
AACGTGGGTA TTCTCAAGAC TTTGGGGAGT TTGGAATGTG CTGACATGGA TACAGATTGG	420
CGCTGACGGC GAGGTCTTCT CCTACGGAAA CAGCTTCTAC GAGGGCAAGA TTCCCGGTCC	480
TCTTACCAAG CGTGACGAGA AAGACCCCGT CGACGCTCTC AAGGACACCG TTGATGTTCT	540
TTCTCTCCCC GTTGAGGCTG ACAAGGCCAA GGCTGAGAAG AAGAGCAAGA ACCACTACAC	600
CTTCACTGGT ACCAAGGGTA CCGTCAGCAA GCCCGAGGCT AAGCTCACCT ACCTTGTTGA	660
TGAGAACAAG GAGCTCAAGC TCACATGGAG AGTTGAGACT GATATTGTTG ACAACTGGCT	720
GTTGACTTAT GTCAATGCTG CCAAGACTGA TGAGGTTGTT GGTGTTGTTG ACTACGTCAA	780
TGAGGCGACA TACAAGGTCT AGTACGTATT TCCATAAATT GACGATTGGG AAAGAATTGA	840
CCGTTGTATT ATAGTCCTTG GGGTGTCAAT GATCOCTCCA AGGGATCTCG CTCCACTGTT	900
GAGAACCCCT GGAATCTCGC GGCCTCCGAG TTCAOCTGGC TCAGCGACGG CTCAAACAAC	960
TACACCACAA CCCGCGGGAA CAATGGAATT GCACAGGTGA ATCCTTCAGG GGGCTCCACG	1020
TATCTGAACA ATTACCGTCC TGATAGCCCG TCGCTGAAGT TCGAGTATGA TTACTIONACC	1080
AGCACCCTA CACCCACCAC CTACCGCGAT GCTTCCATCG CTCAGCTTTT CTACACAGCC	1140
AACAAGTACC ACGACCTCCT CTACCTTCTT GGCTTTACCG AACAGGCTGG TAACTTCCAG	1200
ACCAACAACA ATGGCCAGGG TGGTGTAGGA AACGATATGG TTATCCTCAA CGCTCAGGAC	1260
GGAAGCGGCA CCAACAACGC CAACTTCGCT ACACCCGCTG ACGGTCAGCC CGGCCGCATG	1320
CGAATGTATC TCTGGACATA CAGCACACCC CAGCGTGAAT GCAGTTTCGA CGCTGGCGTT	1380



GTTATCCACG AGTACACTCA CGGTCTCTCC AACCGTCTCA CAGGTGGCCC TGCCAACTCG	1440
GGTTGTCTTC CCGGTGGTGA ATCCGGTGGC ATGGGTGAGG GCTGGGGTGA CTTCATGGCT	1500
ACTGCCATTG ACATCCAATC CAAGGATACC CGCGCTAGCA ACAAGGTCAT GGGTGA CTGG	1560
GTGTACAACA ACGCAGCTGG TATCCGAGCT TATCCTTACA GTACAAGCCT TACCACTAAC	1620
CCTTACACTT ACAAGAGTGT TAACAGTCTC AGTGGAGTCC ATGCTATTGG TACTTACTGG	1680
GCTACTGTTC TGTATGAGGT TATGTGGAAC CTCATCGACA AGCATGGGAA GAATGATGCG	1740
GATGAGCCCA AATTCAACAA CGGCGTTCCT ACAGATGGCA AATATCTTGC TATGAAGTTA	1800
GTAGTGGATG GCATGTCGCT GTAAGTTGTC CCTTGGATTT GTAGGAGTTC TTATCTAACG	1860
TTTAATAGGC AACCTTGCAA CCCCAACATG GTCCAGGCCC GAGACGCCAT CATCGACGCC	1920
GACACCGCTC TTACCAAGGG AGCTAACAAG TGCGAGATCT GGAAGCGCTT TGCCAAGCGT	1980
GGTCTTGGA CTGGTGCCAA GTATAGTGCT TCCAGCGTA CTGAGAGCTT TGCTCTTCCT	2040
TCTGGATGTT AA	2052

( 2 ) 配列番号 2 の情報 :

( i ) 配列特性 :

( A ) 長さ : 2968塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) ストランド : 1 本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖

( ii ) 分子型 : ゲノムDNA

( vi ) 起源 :

( A ) 生物 : *Aspergillus oryzae*

( B ) 株 : IF04177

( C ) 単離体 : NpI

( ix ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : エキソン

( B ) 位置 : 458..817

( ix ) 特徴 :

(A) 名称／キー：エキソン

(B) 位置：868..1262

(ix) 特徴：

(A) 名称／キー：エキソン

(B) 位置：1320..1870

(ix) 特徴：

(A) 名称／キー：エキソン

(B) 位置：1930..2344

(ix) 特徴：

(A) 名称／キー：エキソン

(B) 位置：2404..2587

(xi) 配列記載：配列番号 2：

CCCCGATTG GGAAGACCTT GAATCCAATC TATCGGAGAG CCGACGGAAC GGGTTTTCTT	60
GAACCCAATG TCCCAATTGC TTTGAGAAAA TGGATATTAT TCAATGCCCC TGATCATTAT	120
TGGCATACTC TTCACGGAGT GGTCTGCCCC TGGGCGATTG CTCCACCATG AGGTGCATGA	180
AGGTAACCCC GAGCTGCTAT AGATGAAGTG TGTCGGATAT TGCAGGAGTC TGAATGCGCA	240
GCTGATTGCC CTTTTCCCAC CATGATGAAT GGGACACAAT ATGTCTAGCT CCGGGTTGTC	300
TCGGGCCAAG AAGAAATGCT TCTTTGCGTT GATCCAGCGC GTCGAAATCT CCAATTGAAC	360
CGGTATAAAT AACAGCTGAG CGTCGCAGCA TTCAAGGCAG AAOCATTCCA CAGATCATCT	420
TCTATCATTT GCATTGAGTC CAACGCCCTG GCAGTTCATG ATCGGGGGTC TTCTACTAGC	480
TGGAGCOCTT GGCCTACCTT TGGCCGTCCT TGCGCATCCG ACCCATCATG CACATGGACT	540
TCAACGTCCG ACAGTTGACT TGAATCATT CCGTTTGCAC CAGGCAGCGA AGTATATCAA	600
TGCGACTGAG TCTTCGAGTG ATGTTTCATC TTCTTTCTCT CCCTTCACCG AGCAAAGCTA	660
CGTGGAGACG GCCACTCAGC TCGTGAAGAA TATCCTGCCA GATGCTACCT TCCGTGTCGT	720
CAAGGATCAT TACATTGGTA GCAATGGGGT CGCTCATGTC AATTTTCGTC AGACGGTCCA	780
TGGCCTTGAC ATTGACAATG CGGACTTCAA TGTCAATGTA CGCTGCAGTC CACCTATACT	840
ATGTTCCGGTG CTAACCACTT CATTAGGTT GGGAAAAATG GAAAGATCTT TTCCTATGGC	900

CACTCATTTT ATACGGGCAA AATCCCCGAT GCCAATCCTT TGACGAAGCG GGATTATACC	960
GACCCTGTAG CGGCTCTCAG AGGAACCAAC GAAGCTTTAC AGCTTTCTAT CACTCTAGAT	1020
CAAGTGTCTA CTGAGGCTAC CGAGGACAAA GAGTCCTTCA ATTTCAAGGG AGTCTCTGGC	1080
ACCGTTTCGG ATCCCAAGGC TCAGTTGGTC TACTTGGTAA AGGAAGATGG CAGCCTTGCT	1140
TTGACCTGGA AGGTGGAGAC AGATATTGAC AGCAACTGGC TGTTGACCTA CATCGATGCC	1200
AATACCGGCA AAGATGTCCA TGGTGTGGTT GACTACGTAG CCGAGGCAGA TTACCAAGTA	1260
TAGTGAGTAT TTTAAGAATG TGA CT TGGAC TGTAGAATGA AGCTGACACA CCACCACAGT	1320
GCATGGGGTA TTAATGATCC CACGGAGGGC CCTCGCACCG TCATCAGCGA TCCATGGGAT	1380
TCGTCCGCAT CTGCGTTCAC CTGGATCAGT GACGGAGAAA ACAACTATAC CACA ACTCGC	1440
GGCAACAACG GTATCGCGCA GTCGAACCCT ACCGGTGGAT CGCAGTACTT GAAGAACTAC	1500
CGGCCTGATA GCGCCGATTT GAAATTCCAA TACCOCTATT CGCTCAACGC CACACCCCCA	1560
GAGTCCTATA TTGATCGGTC TATCACTCAG CTTTCTACA CTGCCAACAC GTACCACGAC	1620
CTACTCTACA CTCTGGGCTT CAACGAGGAG GCCGGTAATT TCCAGTACGA TAACAATGGA	1680
AAAGGAGGTG CTGGAAACGA CTACGTGATC CTCAATGCTC AGGACGGTTC TGGCACCAAT	1740
AACGCCAACT TCGCTACGCC CCCGGATGGA CAGCCCGGCC GCATGCGCAT GTACATTTGG	1800
ACCGAGTCCC AGCCTTACCG TGACGGCTCC TTCGAGGCTG GTATTGTGAT TCACGAGTAT	1860
ACTCACGGTC GTATGTATCC CTTATGAACC CCAAGATAAG GCAGTCTGAA CTAACACCAT	1920
GGTACACAGT CTCTAACCGG CTC ACTGGAG GACCTGCTAA CTCTCGCTGC TTGAATGCCC	1980
TTGAATCCGG CGGAATGGGT GAAGGTTGGG GAGACTTCAT GGCCACGGCA ATTCGGCTCA	2040
AGGCCGGCGA TACTCACTCG ACCGATTATA CCATGGGTGA ATGGGCTGCA AACAAGAAAG	2100
GTGGCATCCG TGCTTACCCA TTCTCAACCT CCCTGGAAAC CAACCCTCTC ACCTACACCA	2160
GTCTCAATGA ATTGGACGAA GTGCATGCCA TCGGCGCGGT GTGGGCTAAC GTATTGTACG	2220
AGCTGTTGTG GAACTTGATC GATAAGCACG GCAAGAATGA CGGGCCAAAG CCCGAGTTCA	2280
AGGATGGAGT TCCGACTGAC GGCAAGTATC TCGCCATGAA GCTGGTGATT GATGGCATAG	2340
CATTGTAAGT GCCAACCTCG TTTCTCTTT CTACCTATCG CAGGGGCTAA CCTTGACTTT	2400
TAGGCAAOCT TGCAACCCCA ACTGTGTCCA GGCTCGCGAC GCCATCCTCG ATGCCGATAA	2460
GGCTCTCACC GATGGTGCTA ACAAGTGCGA GATTTGGAAG GCGTTTGCTA AGCGTGGTTT	2520



GGGTGAAGGC GCTGAATACC ATGCGTCTCG TCGGGTGGGC AGTGATAAGG TGCCCTCTGA	2580
TGCTTGCTAG AGTTTGTGTA TATTCTTTCA GCTAGGTGAT TGGGGAGATC CTGTAGGCTG	2640
ACTATAGTTT GAATTTAACA ACATTTCTTA ATTCTTACTG TCAGGTAAC TGCCTGAC	2700
AATAGCATGA ATAGGTTATG GCACTCTGGC CCTTATGTCG GATTCTACA CAATGATTG	2760
TCCTTAAGAA ATACTATCTC AACTCATCAC CCCTCTCATC GTCCGCCGCT TCGAATTCAG	2820
GGTCATTCTT CCCCGTCTC CTGGCCCCCT TGGCCGTCCT GACCTCTGC TTGCTCTCCA	2880
TCTCCCCCTC CACCCTGATC ATAGGTCACG GTGGCCGCCG GTCCACCAG GTGGTTGGGG	2940
CAATAGTTGT TTATAGCACG GGGCTGCT	2968

( 2 ) 配列番号 3 の情報 :

( i ) 配列特性 :

( A ) 長さ : 3922塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) スtrand : 1 本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖

( ii ) 分子型 : cDNA

( vi ) 起源 :

( A ) 生物 : *Aspergillus oryzae*

( B ) 株 : A01560

( C ) 単離個体 : alp

( ix ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : エキソン

( B ) 位置 : 2310..2634

( ix ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : エキソン

( B ) 位置 : 2684..3129

( ix ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : エキソン

(B) 位置 : 3188..3276

(ix) 特徴 :

(A) 名称 / キー : エキソン

(B) 位置 : 3333..3686

(xi) 配列記載 : 配列番号 3 :

GGATCCATAA TGAGCACACT TGAACCTCGC ATGAGTGCTC CATATCTTAG ATCCATTTGA	60
GTCACGAGCG TCGAAGCCAA GGCTAAAAGA AAAGGGACCA AGACCGCCGC ATATCGGGGT	120
GGCTGAACAA TCGCTGCTAG TGTGTACACA GGATACATAA ATTAATCAAG AGCCAATGAC	180
GTTATCGAAG ACATGATATT ACTTACTTGA TTTGTTGCGG TGCTCCGACT CAACTGGATT	240
CAGATGGAAG GGAAGGGATT CTTGATCAGG CTCGTCCCGG GATGACCATT GCTCCTCTCG	300
AATCGAGACA ATGTTGAATG CCCAGGATGA CGATTGAGAG CGAGATATTA AAAAAGAGAT	360
TAAGGGTTGA CGATTGCCAA CGGAAGCCCG ATGGAAGAAG AAATGCCAAG AATTTGGCTG	420
CCTGGATGTT AGTGCCGTTT AGCCTCAGGC CCCAGCTGAA TCCCTGCCAA TCACGAGGCA	480
GGGCTCACCA CCTCCAACCC TTACACAAGA CTCGCCCTCG CTCTTTCCTG CAGGTCCTCT	540
GCTTACTTTC CCCTCTTTTC OCTCCTGAAA TGCCCCGAGA ATGCCGTCCG GAGCTTAGGA	600
AAGCTACGAC GGCTTAATGT TCTAATTTCC CCCACCGACC TGCCCTGGCC AGTTAGACCG	660
CCGGACCCAT CGAATGCAAC ATCACCAACA CTAATTTACC TGCATCTCTG TCAGCCCACT	720
GGGTTTAACT AGATATGCCA AGGACTTGCT TGGCTGGTTT ATGCATGAAG AGAGATGGGC	780
ACTAGTGCGT GCGGGACCAC AAACCTCACC TGCAGAGGGC TCATGCACCT GAAAGACTGC	840
CAATGATCAT TTGACTGGTT AGGTCAAGGG GTTAGGCTTA GAGCCCTTTG CTAATGCCGA	900
TGCCGCCTCT TTGACTGCCA CATTTCTTGG CTTCCCCTCT TGGCCCCTCC CGTCCCTTGA	960
TGCCAAGGGC CTTGGTGGCT CGGACTCCCG GCGGTAGGCT GCCACCTAC TCATGGCGTG	1020
CGGAGATGGG CCATTCAGGT TGTGCCTAAT GACATACTCT GATGCCGACG GGAAGGCCGG	1080
CTGCTTGCTG GTGTCATTGG CTTCTCGAAT GACTCGGAGG ATTGTCGTCT TGCAGGACTT	1140
TTGTGTAACA ACAGGGGCCG ACAGTTGGCG TGGCTGCCGT GGATATGCTT TTGCTGCGAG	1200
CCATGGTTAT TCTGCGGAAC GAAACCAACC TCCCACCCAA ACAGGGCTAA TGTGCCCAGG	1260
TCCTGATACC ATCAGAAGAC CTCCAGGAGC ACATGCCTGT TCGCATAACC GTGGTGTAGC	1320

ACCAGGAATT GCTTAGCTTA GCTTCTTCGA CTGGGGGGCC AGAAAGTGCT TATCGCAAAG	1380
ATCCCACTTC TTTGTGTGAT AGCCCCTCCC GCGGCCCTTG ATCAAGCCGT TCTCGCTCGC	1440
CCATACCGAA ACCGCGATAT TATAGGTGCA GATGGTTATT ATTCTTTTTC TTTTCTTTT	1500
TCTTTGCTTC TCATGCAGCC CCATACGTTG CCGAATTGCG CTACACCTTG GGGCTCATTC	1560
TTCGAAGTTT AGATTCCGAC AAGACCTCAG CACCCAATCA AAACCCTTGA TTCCTGATAA	1620
AAGACGTGGA AAAAAGCGGA TATCGCGTGA GGATGCCAAG CAAAGGGAAT GGGTCACATT	1680
GATCTCTGTC GCGCTGTTAG GATGATCTTC ACTCCTAAAG GCATCGCCGC GGCATTAGGC	1740
CCTTCCCTGT CCAAGATATC GGTACTCCT CTCATTATGG CGAGCTACTT TGTGAATTAA	1800
TTGACTGAGG GATATACCAC CTTCCCTTTG AAGGTACCGA GCCACTACCT TGAGCGTTAG	1860
TTACTTTTTC GAGGAAAGCA TCCTATGCTA GTCTCTGCCA ATCACTGCAG CGTCGACAAC	1920
TTGCCATAGC CTTGTGTTCT TCACGGTCTA TCGGAACACC CGTTCATGAC TGAAAGGGGT	1980
CAGCGTCCGT GGTGGTCAAC ATCATTCTCA TCTTTCATCA TGCCCGCTGA TTGATAGAGT	2040
AATTTCCGGT GGAGCACAAC GCCGTCCTCT GAGATGCAAT GTCACCCTGT AAGTTTCAAC	2100
TACAATCTGT AGTACAGAGC ATCCTTGTA C TTGCATGCTG TGCAAGTGAT CCAAATCCGT	2160
AGAACTTGCT CGAGAACAGG GAAATATAGA ACTCCTGAAG GTTATAAATA CCACATGCAT	2220
CCCTCGTCCA TCCTCACTTC CATCATCAAG CCAGCGGTTT CTATCCTCCG ACTTGAGTTG	2280
TTCTTGCGCA TCTTTACAAT CTTCTCATCA TGCAGTCCAT CAAGCGTACC TTGCTCCTCC	2340
TCGGAGCTAT CCTTCCCGCG GTCCTCGGTG CCCCTGTGCA GGAAACCCGC CGGGCCGCTG	2400
AGAAGCTTCC TGGAAGTAC ATTGTCACAT TCAAGCCCGG CATTGACGAG GCAAAGATTC	2460
AGGAGCATAC CACCTGGGCT ACCAACATTC ACCAGCGCAG TCTGGAGCGT CGTGGCGCCA	2520
CTGGCGGIGA TCTTCCTGTC GGTATTGAGC GCAACTACAA GATCAACAAG TTCGCCGCCT	2580
ATGCAGGCTC TTTCGACGAT GCTACCATTG AGGAGATTCG CAAGAACGAA GATGTTTGTG	2640
GTCATCCGCT CGCATTTTTG AATGACAGCT AACTCGCGCC CAGGTTGCCT ACGTCGAGGA	2700
GGACCAGATC TACTACCTCG ATGGCCTGAC TACCAGAAG AGTGCCCCCT GGGGTCTGGG	2760
CAGCATTTCC CACAAGGGCC AGCAGAGCAC CGACTACATC TACGACACTA GTGCCGGCGA	2820
GGGCACCTAT GCCTACGTGG TGGATAGCGG TGTC AATGTC GACCATGAGG AGTTCGAGGG	2880
CCGCGCCAGC AAGGCCTACA ACGCTGCCGG TGGTCAGCAT GTGGACAGCA TTGGCCATGG	2940

CACCCACGTT TCCGGCACCA TTGCTGGCAA GACTTATGGT ATCGCCAAGA AGGCCAGCAT	3000
OCTTTCGGTC AAAGTTTTCC AGGGTGAATC GAGCAGCACT TCGTCATTC TTGACGGCTT	3060
CAACTGGGCT GCCAACGACA TTGTTAGCAA GAAGCGTACC AGCAAGGCTG CAATCAACAT	3120
GAGCTTGGGT GAGTTTACAT TGTCTTCTC TACTTGAAC GCGCGAGCGC TAATTTCAA	3180
AACACAGGCG GTGGCTACTC TAAGGCTTTC AACGATGCGG TCGAGAACGC ATTCGAGCAG	3240
GGTGTCTCT CGGTTGTGCG TGCCGGTAAC GAGAACGTAC GTCTCCCCTC CATCGCGCAA	3300
AGACGAATTC GTAACGACT TGATTTTCTT AGTCTGATGC CGGCCAAACC AGCOCTGCCT	3360
CTGCCCCTGA TGCCATCACT GTTGCCGCTA TCCAGAAGAG CAACAACCGC GCCAGTTTCT	3420
CCAACTTTGG CAAGGTCGTT GACGTCTTCG CTCCCGGTCA AGATATCCTT TCTGCCTGGA	3480
TTGGCTCTTC CTCTGCCACC AACACCATCT CTGGTACCTC CATGGCTACT CCCACATTG	3540
TCGGCCTGTC CCTCTACCTC GCTGCCCTTG AGAACCTCGA TGGCCCGCT GCCGTGACCA	3600
AGCGCATCAA GGAGTTGGCC ACCAAGGACG TCGTCAAGGA TGTTAAGGGC AGCCCTAACC	3660
TGCTTGCCTA CAACGGTAAC GCTTAAGTAC CAGGAGTACG TCGCAGGATT CTACCATTGT	3720
TACTGGAATA CAATGATGAT TAGAAAACGA AGAGCGTTAT GATTCGGACG GATATATGCA	3780
TGGCACCCAT ACAGCGTGAT ACATAGGCTG TTTGCTCAAG AATTAGGATT TTATCTGAAT	3840
CCATGTACAG AGTATACTTA TGTTAGTAGT CAATAAAATC TTGGCTTTCT AATTTTGTCC	3900
CATCTACAAG GGGTCGTGCA TC	3922

( 2 ) 配列番号 4 の情報 :

( i ) 配列特性 :

( A ) 長さ : 36塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) スtrand : 1 本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖

( ii ) 分子型 : cDNA

( xi ) 配列記載 : 配列番号 4 :

CCCTCGGGCT CGGACCCCGC CTTCTCGCA GCCCAAG

( 2 ) 配列番号 5 の情報 :



## (i) 配列特性 :

(A) 長さ : 41塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) スtrand : 1 本鎖

(D) トポロジー : 直鎖

## (ii) 分子型 : cDNA

## (xi) 配列記載 : 配列番号 5 :

CCCTCGTTCG TCAGGCCCGC GTCCAGCACG GACTTGGGCT G

## (2) 配列番号 6 の情報 :

## (i) 配列特性 :

(A) 長さ : 1029塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) スtrand : 1 本鎖

(D) トポロジー : 直鎖

## (ii) 分子型 : cDNA

## (vi) 起源 :

(A) 生物 : *Candida antarctica*

(C) 単離体 : clb

## (xi) 配列記載 : 配列番号 6 :

ATGAAGCTAC TCTCTCTGAC CGGTGTGGCT GGTGTGCTTG CGACTTGCGT TGCAGCCACT	60
OCTTTGGTGA AGCGTCTACC TTCCGGTTCG GACCCTGCCT TTTCGCAGCC CAAGTCGGTG	120
CTCGATGCGG GTCTGACCTG CCAGGGTGCT TCGCCATCCT CGGTCTCCAA ACCCATCCTT	180
CTCGTCCCCG GAAOCGGCAC CACAGGTCCA CAGTCGTTCG ACTCGAACTG GATCCCCCTC	240
TCAACGCAGT TGGGTTACAC ACCCTGCTGG ATCTCACCCC CGCGTTTCAT GCTCAACGAC	300
ACCCAGGTCA ACACGGAGTA CATGGTCAAC GCCATCACCG CGCTCTACGC TGGTTCGGGC	360
AACAACAAGC TTCCCGTGCT TACCTGGTCC CAGGGTGGTC TGGTTGCACA GTGGGGTCTG	420
ACCTTCTTCC CCAGTATCAG GTCCAAGGTC GATCGACTTA TGGCCTTTGC GCCCGACTAC	480

AAGGGCAACG TCCTCGCCGG CCTCTCGAT GCACTCGCGG TTAGTGCACC CTCGTATGG	540
CAGCAAACCA CCGGTTCCGGC ACTCACCACC GCACTCCGAA ACGCAGGTGG TCTGACCCAG	600
ATCGTGCCCA CCACCAACCT CTACTCGGCG ACCGACGAGA TCGTTCAGCC TCAGGTGTCC	660
AACTCGCCAC TCGACTCATC CTACCTCTTC AACGGAAAGA ACGTCCAGGC ACAGGCCGTG	720
TGTGGGCCGC TGTTCGTCAT CGACCATGCA GGCTCGCTCA CCTCGCAGTT CTCCTACGTC	780
GTCGGTCGAT CCGCCCTGCG CTCCACCACG GGCCAGGCTC GTAGTGCAGA CTATGGCATT	840
ACGGACTGCA ACCCTCTTCC CGCCAATGAT CTGACTCCCG AGCAAAAGGT CGCCGCGGCT	900
GCGCTCCTGG CGCCGGCAGC TGCAGCCATC GTGGCGGGTC CAAAGCAGAA CTGCGAGCCC	960
GACCTCATGC CCTACGCCCCG CCCCTTTGCA GTAGGCAAAA GGACCTGCTC CGGCATCGTC	1020
ACCCCCTGA	1029

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

**JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DRAWINGS**

---

[Drawing 1]



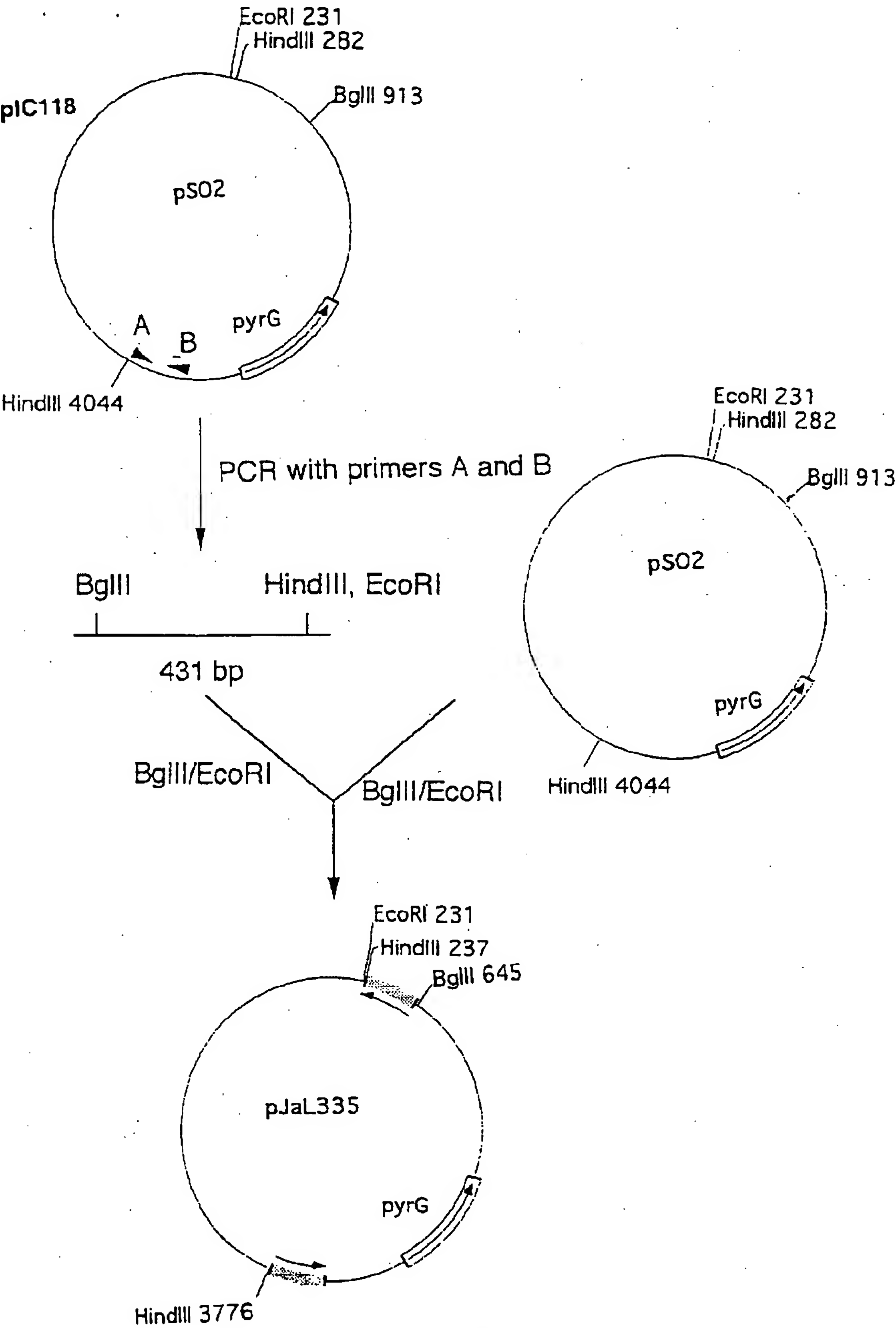


Fig. 1

[Drawing 2]

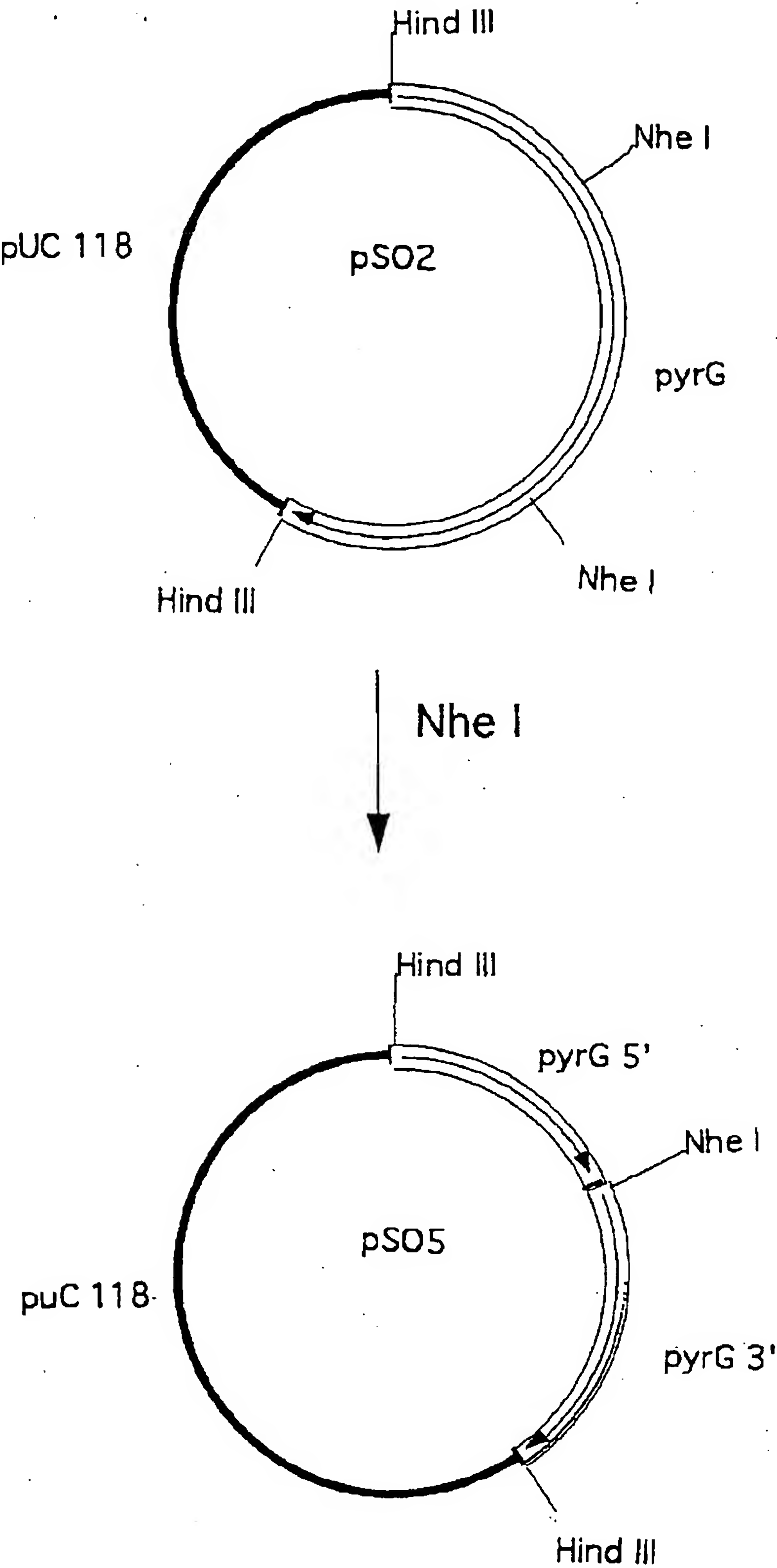


Fig. 2

[Drawing 3]

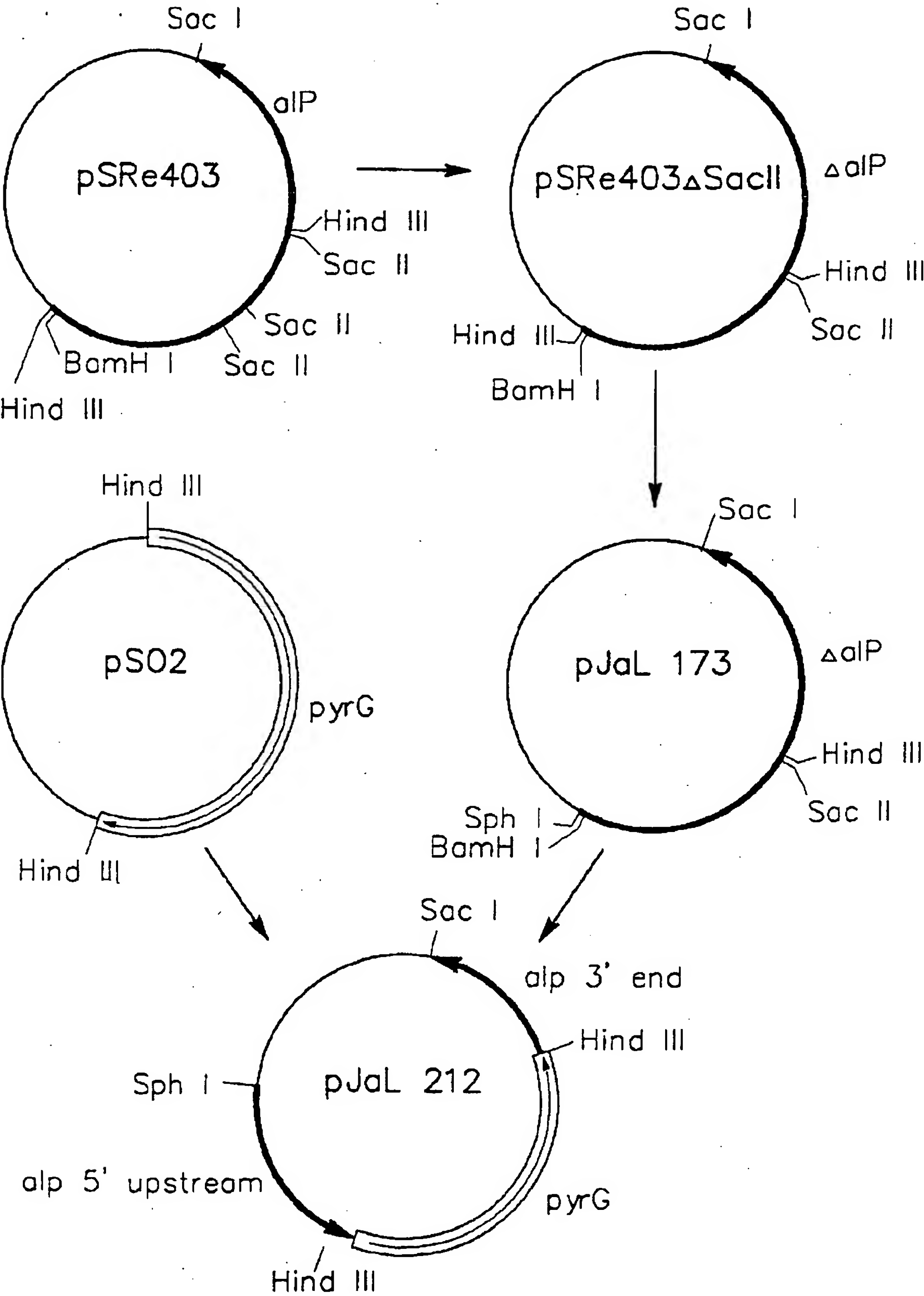


Fig. 3

[Drawing 4]



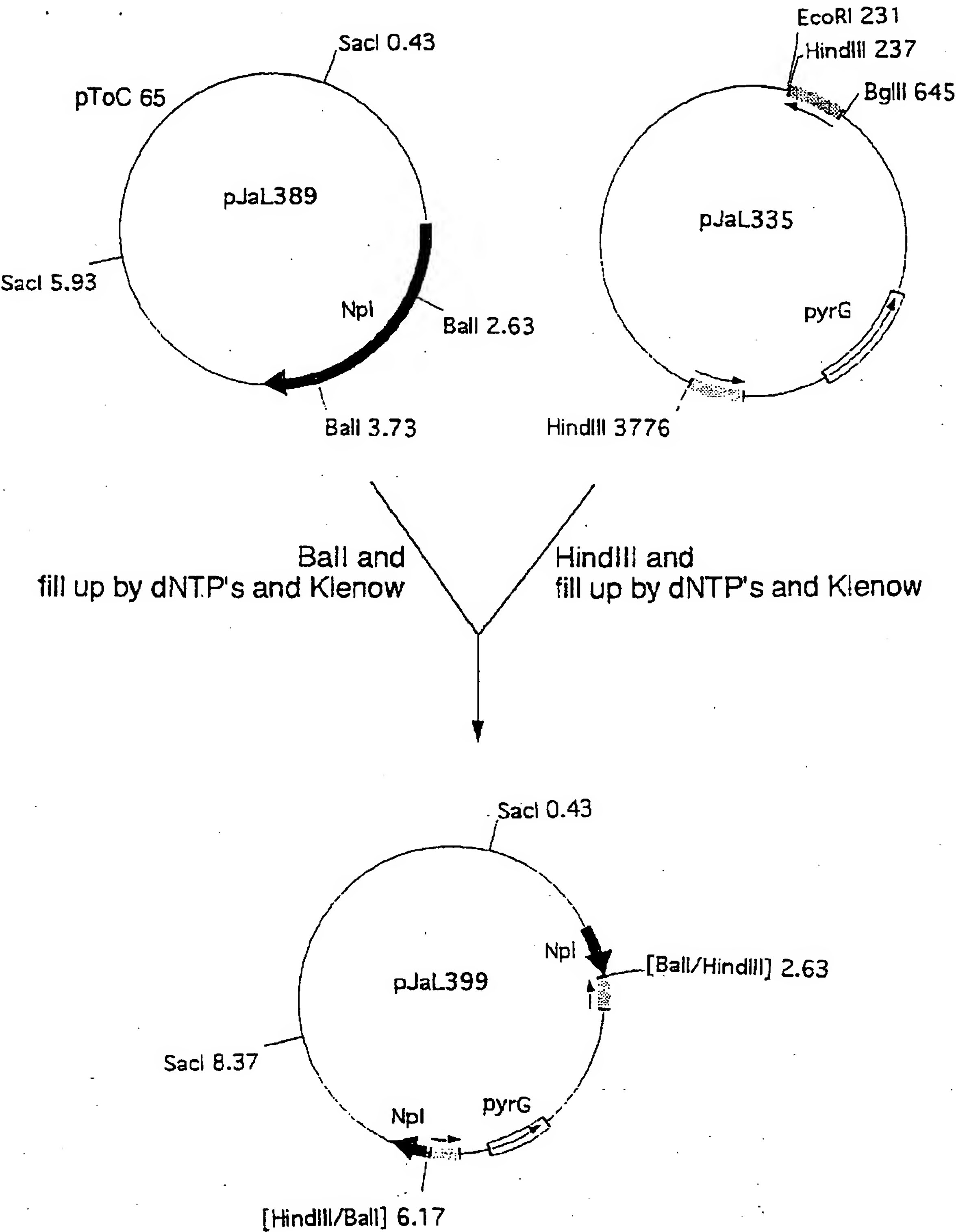


Fig. 4

[Drawing 5]

C.アンタークチカリバーゼBのN末端アミノ酸配列

L P S G S D P A F S Q P K S V L D A G L T N E G

NOR930



NOR929

NOR929

CCCTCGGGCTCGGACCCCGCCTTCTCGCAGCCCAAG

G

G G

T

NOR930

CCCTCGTTCGTCAGGCCCGCGTCCAGCACCGACTTGGGCTG

G G

G

G

Fig. 5

[Drawing 6]

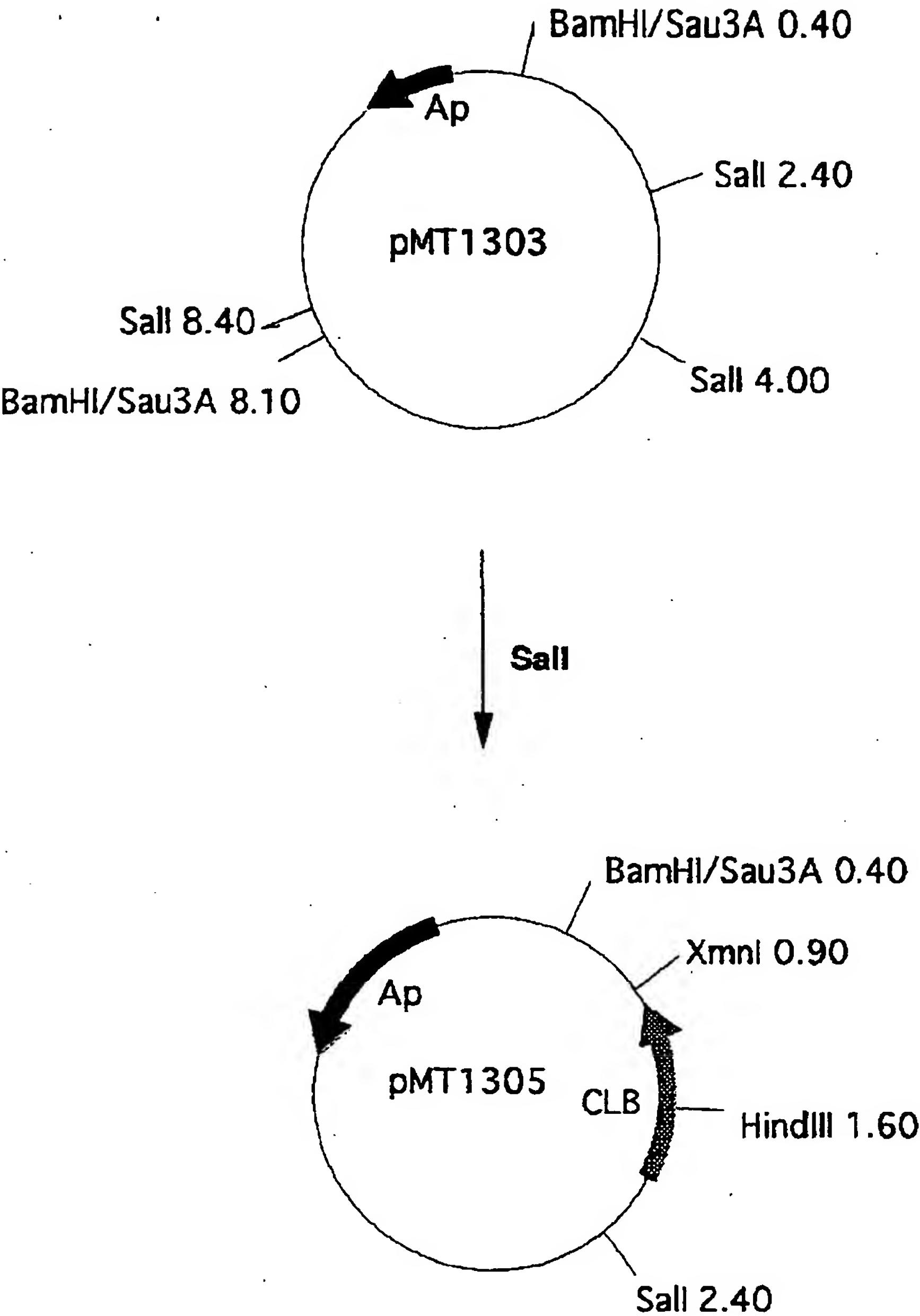
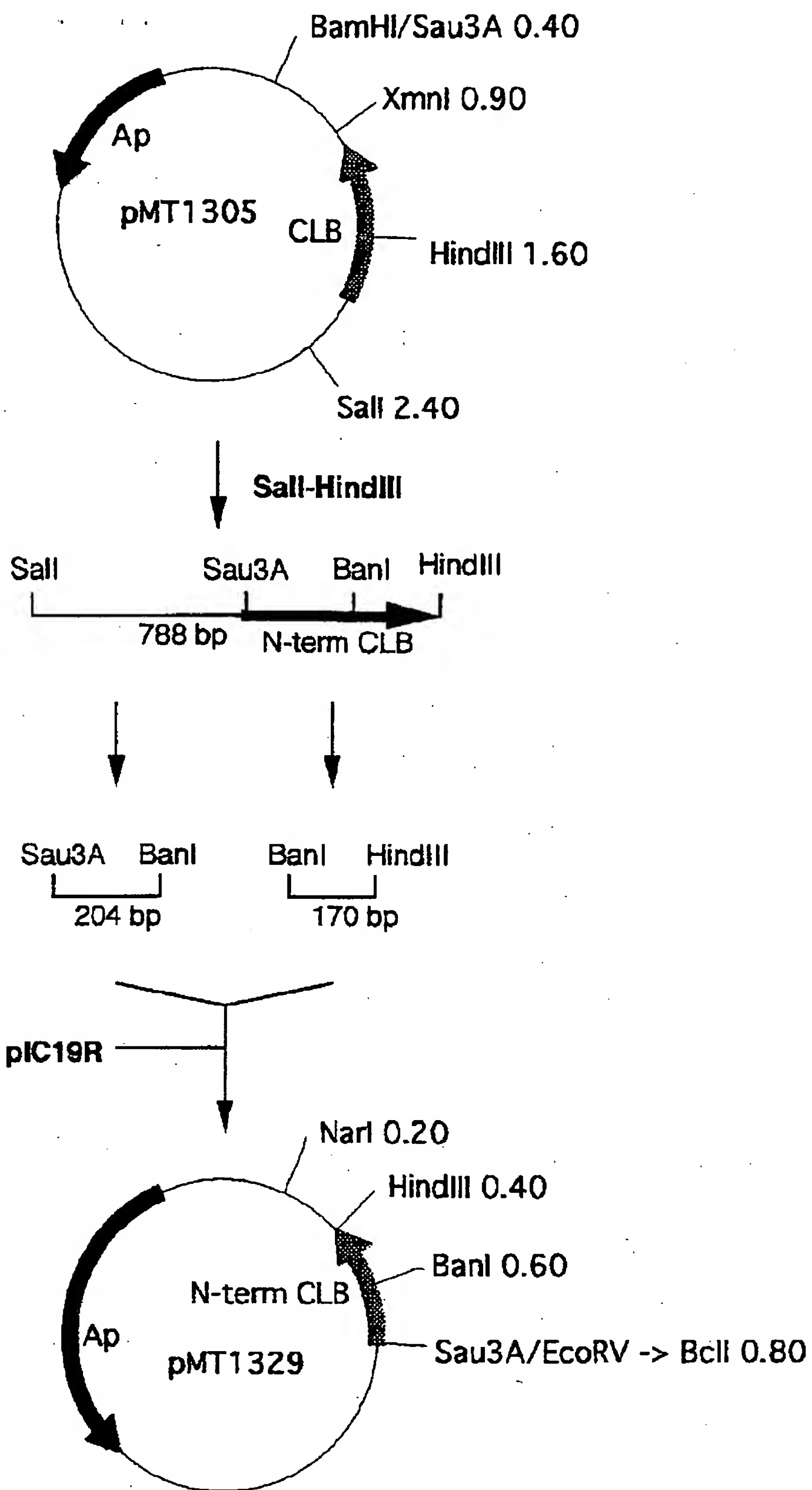


Fig. 6

[Drawing 7]



**Fig. 7**

[Drawing 8]

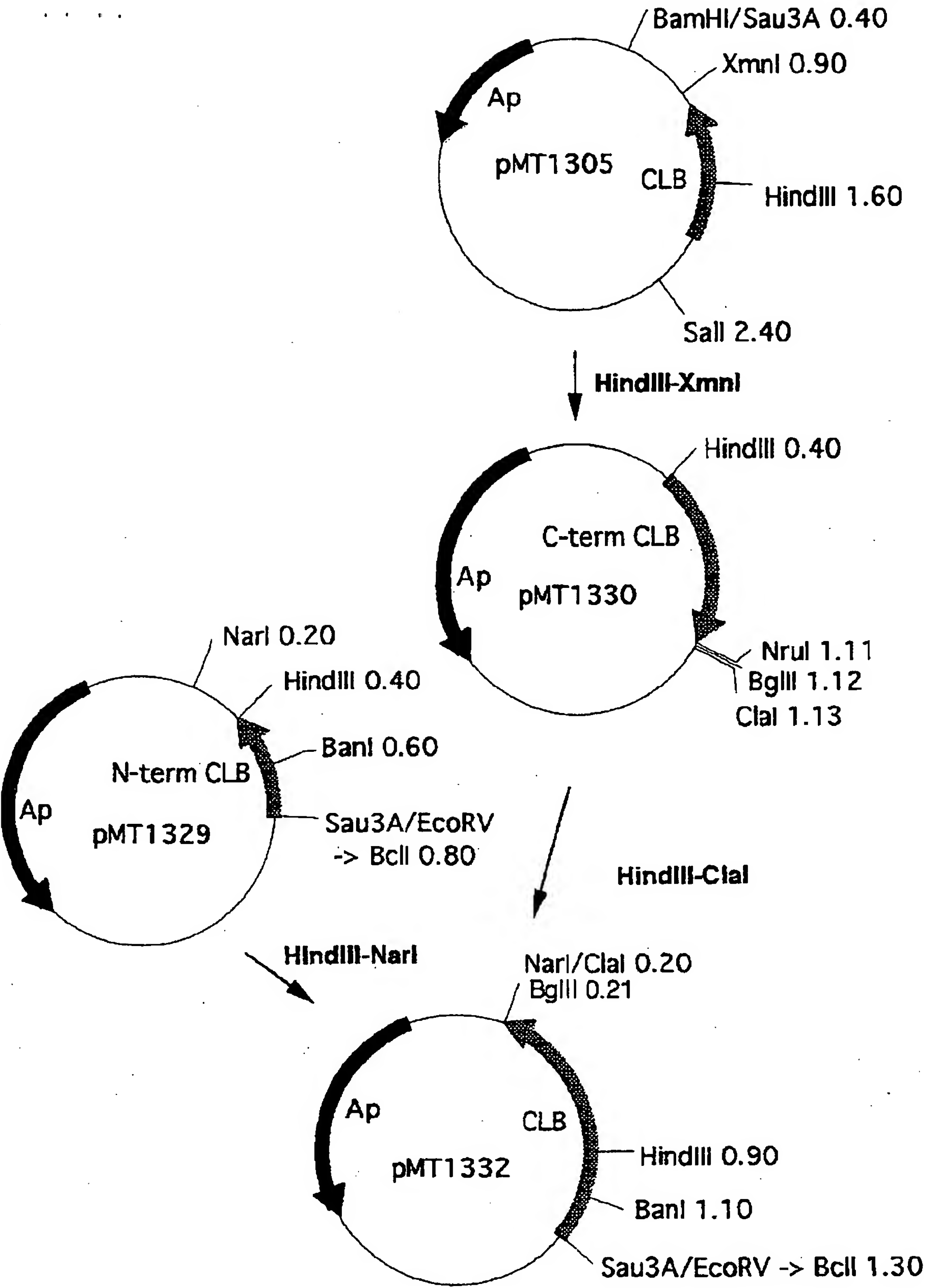


Fig. 8

[Drawing 9]

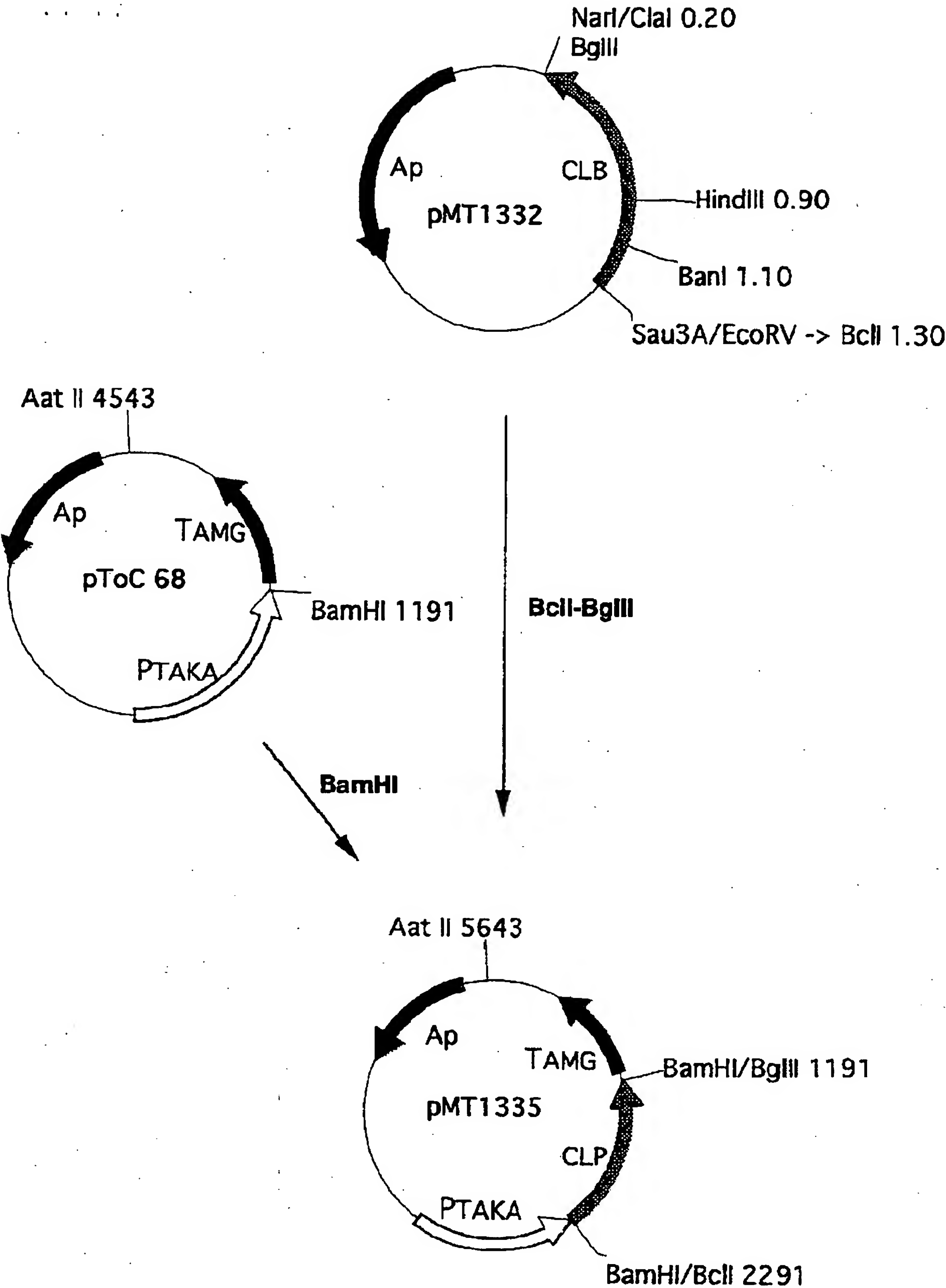


Fig. 9

## \* NOTICES \*

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

WRITTEN AMENDMENT

---

[Procedure revision] The 8 1st term of Article 184 of Patent Law

[Filing Date] October 16, Heisei 10 (1998. 10.16)

[Proposed Amendment]

## CLAIMS

1. It is Yarn-like Fungus Cell Useful to Manifestation of Different-Species Nature Protein Product, and is Array Number.

The array, the DNA array same at least 70% to this, or the array number 2 of 1

Inside [ that the code is carried out by the array or the DNA array same at least 70% to this ]

It is to the array of a \*\*\*\* METARO protease and the array number 3, or this.

The internality alkaline protease the code is carried out [ alkaline protease ] by the DNA array same 70%

It is recombination to the appearance discovered on the level which was inactivated functionally or fell.

Said cell embellished by the DNA technique.

2. Said Cell is Acremonium (Acremonium) and Aspergillus (Aspergillu).

s), Candida (Candida), Cochliobolus (Cochliobolus), en DOSHIA (Endothia)

Fusarium (Fusarium), HYUMIKORA (Humicola), Neurospora (Neurospora)

A RIZOMU call (Rhizomucor), Rhizopus (Rhizopus), a thermostat married woman (Thermomyce)

s), Trichoderma (Trichoderma), PODOSUPORA (Podospora), Pyricularia (Pyric)

It is the strain chosen from ularia and the group of a penicillium (Penicillium) group.

The yarn-like fungus cell of claim 1.

3. Said Strain is Aspergillus NIDEYU Lance (Aspergillus Nidulans) and A.

Spelling GIRUSU AWAMORI (Aspergillus awamori), Aspergillus FENIKISU

Aspergillus phoenicis, Aspergillus JAPONIKASU (Aspergillus japonic)

us), Aspergillus FITASU (Aspergillus foetus), fusarium OKISHI

SUPORAMU (Fusarium oxysporum), Fusarium solani (Fusarium solani), HYU

MIKORA GURISEA (Humicola grisea), Neurospora KURASA (Neurospora cra)

ssa, Penicillium chrysogenum (Penicillium chrysogenum), a RIZOMU call

. MEIHEI (Rhizomucor meihei),

Trichoderma RESEI (Trichoderma reesei) and Trichoderma viride (Tri)

The cell of claim 2 chosen from the groups of choderma viride.

4. Said Strain is Aspergillus Oryzae (Aspergillus Oryzae) and ASUPERUGI.

The fusarium group identified by RUSU nigre (Aspergillus niger) and ATCC20334

The cell of claim 2 chosen from the groups of a seed.

5. Said METARO Protease is METARO Protease of Fusarium Group,

The cell of claim 1.

6. Said METARO Protease is Meta-ROPURITE of Fusarium Oxy-SUPORAMU.

The cell of claim 5 which is ase.

7. Said METARO Protease is Nucleotide Sequence of Array Number 1, or this.

The cell of claims 5 or 6 which is alike and has the DNA array same at least 70%.

8. Said METARO Protease is Optimum Proteolysis \*\* at PH about Six to 8 within the Limits.

The cell of the 1st term of the arbitration of claim 5-7 which is the neutral METARO protease which shows a sex.

9. Said METARO Protease is NpI of Aspergillus, or Neutrality of NpII(s).

The cell of claim 8 which is a METARO protease.



10. Said METARO Protease is Nucleotide Sequence of Array Number 2, or this.

ASUPERUGIRU which has the amino acid sequence which is alike and originates in the DNA array same at least 70%

The cell of claim 9 which is the neutral METARO protease I of SU ORIZE.

11. Said Alkaline Protease is Alkaline Protea of Aspergillus.

The cell of claim 1 which is - ZE.

12. Said Alkaline Protease -- Nucleotide Sequence of Array Number 3 -- Or cD which includes the DNA array same at least 70% in this

The cell of claim 11 in which the code is carried out by NA array.

13. Array Which Carries Out Code of Said METARO Protease, or the Control Array and Before

Account alkaline protease is set the array which carries out a code, or in the control array, and it is a group.

The cell of the 1st term of the arbitration of claim 1-12 hereditarily embellished by the substitute DNA technique

14. That Said Technique is Specific or Mutation by Random Mutation and PCR, Part

The deletion of specific DNA, insertion and/or a permutation, gene disruption or gene substitution, A

The cell of claim 13 which are the NCHISENSU methods or such combination.

15. Level of METARO Protease -- about 50% -- Large -- Desirable -- about 85%

\*\* -- it is large, is preferably larger than about 90%, and falls more greatly [ it is the most desirable and ] than about 95%

The cell of the 1st term of the arbitration of claim 1-14 carried out.

16. Level of Alkaline Protease Activity -- about 50% -- Large -- Desirable

It is larger than about 85%, preferably larger than about 90%, and size from about 95% most preferably.

The cell of the 1st term of the arbitration of claim 1-15 which it hears and which is falling.

17. Fall of METARO Protease and Alkaline Protease Activity is Claim.

The 1st term of the arbitration of claim 1-14 which is the combination of the arbitration of a fall shown in 15 or 16

\*\*\*\*\*.

18. Said Cell is Essentially METARO Protease and Alkaline PUROTE of Arbitration.

The cell of the 1st term of the arbitration of claim 1-17 which does not include ase activity.

19. Fall Manifestation of METARO Protease Activity and Alkaline Protease Activity.

It is \*\*\*\*\* hereditarily by recombinant DNA technology about said cell so that it may carry out or may remove.

How to produce the cell of \*\* and the 1st term of the arbitration of claim 1-18.

20. Array Which Carries Out Code of Said METARO Protease, or the Control Array and Before

Before setting account alkaline protease the array which carries out a code, or in the control array

The approach of claim 19 which embellishes an account cell hereditarily by recombinant DNA technology.

21. Produce Different-Species Nature Protein Product in Cell of 1st Term of Arbitration of Claim 1-18.

It is the approach of carrying out,

(a) About the nucleic-acid array which carries out the code of said protein product, it is introductory \*\*\*\*\* to intracellular [ said ].

Degree;

(b) Process which cultivates the cell of a process (a) in a suitable growth medium;

(c) Process which isolates said protein product;

Said approach of being by \*\*\*\*\*.

22. Gene Product with which Therapy Activity Has Said Protein Product, for Example, Insulin

A growth hormone, glucagon, somatostatin, interferon, EPO, TPO,

PDGF, factor VII, factor VIII, urokinase, chymosin, or organization PURASUMINO

The approach of claim 21 which is - gene activator or serum albumin.

23. The Approach of Claim 21 that Said Protein Product is Protein of Fungus Origin.

24. Said Protein Product is Enzyme of Fungus, especially Amylolytic Enzyme, for Example, Alpha.

An amylase, beta amylase, glucoamylase, a beta galactosidase, a cel low

A SU dialytic ferment, a lipolytic enzyme, a xylan dialytic ferment, protease, oxidation reduction

An enzyme, for example, a peroxidase, or a laccase, a pectinase, or KUCHI

The approach of claim 23 which is NAZE.

25. The Approach of Claim 21 that Said Protein Product is Protein of Bacteria Origin

26. Said Protein Product is Precursor Protein, I.e., Anemarrhena Rhizome.

It is obtained as - gene, hybrid protein, a pro array, or a pre pro array.

Claim 21-25 which is protein or protein of other immature molds of arbitration

\*\* — the approach of the 1st arbitrary term.

---

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号  
特表2001-500381  
(P2001-500381A)

(43) 公表日 平成13年1月16日 (2001.1.16)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
1/15		1/15	
1/19		1/19	
C 1 2 P 21/02		C 1 2 P 21/02	C
// C 1 2 N 9/50		C 1 2 N 9/50	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 58 頁)			

(21) 出願番号 特願平10-514203  
(86) (22) 出願日 平成9年9月19日 (1997.9.19)  
(85) 翻訳文提出日 平成11年3月5日 (1999.3.5)  
(86) 国際出願番号 P C T / D K 9 7 / 0 0 3 9 7  
(87) 国際公開番号 W O 9 8 / 1 2 3 0 0  
(87) 国際公開日 平成10年3月26日 (1998.3.26)  
(31) 優先権主張番号 1 0 2 4 / 9 6  
(32) 優先日 平成8年9月19日 (1996.9.19)  
(33) 優先権主張国 デンマーク (D K)

(71) 出願人 ノボ ノルディスク アクティーゼルスカ  
ブ  
デンマーク国, デーコ—2880 バグスバ  
エルト, ノボ アレ  
(72) 発明者 レムベック, ヤン  
デンマーク国, デーコ—2880 バグスバ  
エルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク  
アクティーゼルスカブ  
(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な宿主細胞およびタンパク質生産方法

(57) 【要約】

本発明は、新規な宿主細胞およびタンパク質の生産方法に関する。詳しくは、本発明は、異種性タンパク質を発現させるために有用な宿主細胞であって、メタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼの発現レベルを有意に低下させる様に遺伝的に修飾した前記宿主細胞に関する。さらに、本発明は、適当な培地中で前記宿主細胞を培養すること、続いて前記の希望タンパク質を回収することを含んで成る、異種性タンパク質を生産する方法に関する。

## 【特許請求の範囲】

1. 異種性タンパク質生産物の発現に有用な宿主細胞であって、親細胞に比べて、メタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼ活性が有意に低下して発現する様に遺伝的修飾を受けた前記細胞。

2. 前記細胞が真菌細胞である、請求項1の宿主細胞。

3. 前記細胞が酵母細胞である、請求項1の宿主細胞。

4. 前記細胞が、サッカロミセス属の菌株、好ましくはサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) である、請求項3の宿主細胞。

5. 前記細胞が糸状真菌である、請求項2の宿主細胞。

6. 前記細胞が、アクレモニウム (*Acremonium*)、アスペルギルス (*Aspergillus*)、カンジダ (*Candida*)、コクリオボラス (*Cochliobolus*)、エンドシア (*Endothia*)、フサリウム (*Fusarium*)、ヒュミコラ (*Humicola*)、ニューロスボラ (*Neurospora*)、リゾムコール (*Rhizomucor*)、リゾプス (*Rhizopus*)、サーモミセス (*Thermomyces*)、トリコデルマ (*Trichoderma*)、ポドスポラ (*Podospora*)、ピリクラリア (*Pyricularia*)、およびペニシリウム (*Penicillium*) 属の群中から選択される菌株である、請求項5の宿主細胞。

7. 前記細胞が、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・フェニキス (*Aspergillus phoenicis*)、アスペルギルス・ジャポニカス (*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・フィータス (*Aspergillus foetus*)、フサリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*)、フサリウム・ソラニ (*Fusarium solani*)、ヒュミコラ・グリセア (*Humicola grisea*)、ニューロスボラ・クラサ

(*Neurospora crassa*)、ペニシリウム・クリソゲナム (*Penicillium chrysogenum*)、リゾムコール・メイヘイ (*Rhizomucor meihei*)、トリコデルマ・レセイ (*Trichoderma reesei*)、およびトリコデルマ・ビリデ (*Trichoderma viride*) の群中から選択される菌株である、請求項6の宿主細胞。

8. 前記細胞が、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) および ATCC20334 で同定されるフサリウム属の



種の群中から選択される菌株である、請求項6の宿主細胞。

9. 前記メタロプロテアーゼが、フサリウム属のメタロプロテアーゼである、請求項1-8の任意の1項の宿主細胞。

10. 前記メタロプロテアーゼが、フサリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*) のp45メタロプロテアーゼである、請求項9の宿主細胞。

11. 前記メタロプロテアーゼが、配列番号1の核酸配列、またはこれに相同な配列を有するフサリウム・オキシスポラムのp45メタロプロテアーゼである、請求項10の宿主細胞。

12. 前記メタロプロテアーゼが、pH約6-8の範囲内で、至適タンパク質分解活性を示す中性メタロプロテアーゼである、請求項1-11の任意の1項の宿主細胞。

13. 前記メタロプロテアーゼが、アスペルギルス属のNpIまたはNpII類の中性メタロプロテアーゼである、請求項12の宿主細胞。

14. 前記メタロプロテアーゼが、アスペルギルス・オリゼの中性メタロプロテアーゼI、好ましくは配列番号2の核酸配列またはこれの相同配列に由来するアミノ酸配列を有するものである、請求項13の宿主細胞。

15. 前記アルカリ性プロテアーゼが、アスペルギルス属のアルカリ性プロテアーゼである、請求項1-14の任意の1項の宿主細胞。

16. 前記アルカリ性プロテアーゼが、好ましくは、配列番号3の核酸配列またはこれの相同配列を含むcDNA配列によってコードされているものである、請求項15の宿主細胞。

17. 前記細胞が、前記メタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼ遺伝子内にコードされている構造領域および制御領域において遺伝的に修飾される、請求項1-16の任意の1項の宿主細胞。

18. 前記細胞が、特異的またはランダム突然変異、PCRによる突然変異、部位特異的DNAの欠失、挿入および／または置換、遺伝子破壊または遺伝子置換、アンチセンス法、あるいはこれらの組み合わせによって、遺伝的に修飾される、請求項17の宿主細胞。

19. メタロプロテアーゼのレベルが、約50%より大きく、好ましくは約85%よ

り大きく、好ましくは約90%より大きく、最も好ましくは約95%より大きく低下する、請求項1-18の任意の1項の宿主細胞。

20. アルカリ性プロテアーゼ活性のレベルが、約50%より大きく、好ましくは約85%より大きく、好ましくは約90%より大きく、最も好ましくは約95%より大きく低下する、請求項1-18の任意の1項の宿主細胞。

21. メタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼ活性の低下が、請求項19または20に示された低下の任意の組み合わせである、請求項1-18の任意の1項の宿主細胞。

22. 前記細胞が、本質的に任意のメタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼ活性を含まない、請求項1-21の任意の1項の宿主細胞。

23. 親細胞に比べて、メタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼ活性が有意に低下して発現する様に、親細胞を修飾するこ

とを含む、請求項1-22の任意の1項の宿主細胞を生産する方法。

24. 前記細胞が、前記メタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼ遺伝子内にコードされている構造領域および／または制御領域において遺伝的に修飾されることを含む、請求項1-22の任意の1項の宿主細胞を生産する方法。

25. 請求項1-22の任意の1項の宿主細胞において、異種性タンパク質生産物を生産する方法であって、

(a) 前記タンパク質生産物をコードする核酸配列を、前記細胞内に導入する工程；

(b) 適当な増殖培地中で、工程(a)の宿主細胞を培養する工程；

(c) 前記異種性タンパク質生産物を単離する工程；

を含んでいる前記方法。

26. 前記タンパク質生産物が、治療活性のある遺伝子産物、例えばインスリン、成長ホルモン、グルカゴン、ソマトスタチン、インターフェロン、EPO、TPO、PDGF、第VII因子、第VIII因子、ウロキナーゼ、キモシンまたは組織プラスミノゲンアクチベーターまたは血清アルブミンである、請求項25の方法。

27. 前記タンパク質生産物が、真菌由来のタンパク質である、請求項25の方法

。

28. 前記タンパク質生産物が、真菌の酵素、特にデンプン分解酵素、例えば $\alpha$ アミラーゼ、 $\beta$ アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 $\beta$ ガラクトシダーゼ、セルロース分解酵素、脂質分解酵素、キシラン分解酵素、タンパク質分解酵素、酸化還元酵素、例えばペルオキシダーゼまたはラッカーゼ、ペクチナーゼ、あるいはクチナーゼである、請求項27の方法。

29. 前記タンパク質生産物が、細菌のタンパク質である、請求項

25の方法。

30. 前記タンパク質生産物が、前駆体タンパク質、すなわちチモーゲン、ハイブリッドタンパク質、プロ配列またはプレプロ配列として得られるタンパク質、あるいは任意の他の未成熟な型のタンパク質である、請求項25-29の任意の1項の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 新規な宿主細胞およびタンパク質生産方法

## 発明の分野

本発明は、新規な真菌宿主細胞およびタンパク質の生産方法に関する。詳しくは、本発明は、異種性タンパク質を発現させるために有用な宿主細胞であって、メタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼの発現レベルを有意に低下させるために遺伝的に修飾した前記宿主細胞に関する。さらに、本発明は、本発明の前記真菌を用いて、注目のタンパク質を高収率に生産する方法であって、適当な培地中で前記宿主細胞を培養すること、続いて前記の希望タンパク質を回収することを含んで成る前記方法に関する。さらに本発明は、前記真菌および前記方法で用いるDNA構成体を作成する方法も含む。

## 発明の背景

最近、異種性タンパク質の発現において組換え宿主細胞を利用することによって、市場価値のあるタンパク質を非常に簡単に大量生産することができる。これを利用しなければ、その様なタンパク質を、天然の素材から精製して得なければならない。現在、任意のタンパク質を生産するための発現系は、多種類あり、例えば、細菌宿主および真核生物宿主がある。適当な発現系の選択は、多くの場合、活性のあるタンパク質を適当な収率で生産する宿主細胞能力に依るだけでなく、そのタンパク質の最終使用目的にも非常に支配され得る。

この主要な問題点は、宿主細胞によって生産されるか、または培

地中に存在する高レベルのタンパク質分解酵素である。特異的なタンパク質分解性化合物の生産能力を除去した宿主生物が提供され得ることが示唆されている。

例えば、国際特許出願W090/0192 (Genencor)には、酵素活性を有するアスパラギン酸プロティナーゼを分泌できない糸状真菌宿主が記載されていて、EP574 347 (Ciba Geigy AG)には、ズブチリシン型セリンプロテアーゼを欠失したアスペルギラス属 (*Aspergillus*) 宿主が記載されている。

メタロプロテアーゼは、多くの真核生物から単離されている。アスペルギラス属から単離された中性メタロプロテアーゼ、すなわちpHが中性の時に至適活性を



示すメタロプロテアーゼも報告されている。アスペルギルス・ソジャエ (*Aspergillus sojae*) から単離された2つのメタロプロテアーゼ、NpIおよびNpIIの物理化学特性が、一連の研究から報告されている (Sekine, H. 1972. *Agric. Biol. Chem.* 36: 198-206, 207-216; Sekine, H. 1972. *Agric. Biol. Chem.* 36: 2143-2150)。NpIの酵素特性および物理化学特性は、バチルス・サーモプロテオリチカス (*Bacillus thermoproteolyticus*) のサーモリシンの特性に似ているが、NpIIの特性は、それに似ていないことが明らかにされた。最近、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) から単離された中性メタロプロテアーゼNpIIのcDNA配列が開示された (Tatsumi H, et al. 1991. *Mol. Gen. Genet.* 228: 97-103)。しかし、A.オリゼからのNpI類に属する中性メタロプロテアーゼのcDNA配列は、開示されていない。

アルカリ性プロテアーゼは、至適pHがアルカリ性であるセリンプロテアーゼである (Nakagawa, Y. 1970. *Methods Enzymol.* 19: 581-591)。これは、ズブチリシンの類似体であり、そしてA.オリゼにおいて、主要な細胞外のアルカリ性エンドペプチダーゼである。この遺伝子は単離されていて、配列特性が明らかにされている (Murakami, et al. 1991. *Agric. Biol. Chem.* 55: 2807-2811)。アスペルギルス属の他の2種、A.フラブス (*A. flavus*) およびA.ソジャエは、同一酵素かまたは近縁の酵素を発現している。

アスペルギルス属から得られるタンパク質生産物の安定性を低下させることに関する、メタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼの潜在的な役割は、報告されていない。

#### 発明の要約

本発明では、メタロプロテアーゼIおよびアルカリ性プロテアーゼのタンパク質分解活性は、各々単独で、または組み合わさって、細胞が生産する注目のタンパク質生産物の安定性を有意に低下させ、前記タンパク質の収量を減少させる可能性があることを見出した。

従って、本発明は、異種性タンパク質生産物の発現に有用な宿主細胞であって、親細胞に比べて、メタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼの両レベ

ルが有意に低下する様に遺伝的に修飾した前記細胞を提供する。

別の点では、本発明は、本発明の宿主細胞において異種性タンパク質生産物を生産する方法であって、前記タンパク質をコードする核酸配列を前記宿主細胞に導入すること、適当な培地中で前記宿主細胞を培養すること、および前記異種性タンパク質生産物を回収することを含んで成る前記方法を提供する。

本発明の方法によって、メタロプロテアーゼ I およびアルカリ性プロテアーゼに起因するタンパク質分解活性が有意に低下し、その結果、本方法によって得られるタンパク質の安定性および収量が向上する。さらに、本発明の方法によって得られるタンパク質は、前駆体タンパク質、例えばチモーゲン、融合タンパク質、プロ配列ま

たはプレプロ配列として得られるタンパク質、または他の任意の未成熟な型のタンパク質でもよい。

#### 図面の簡単な説明

添付した図面を参考にして、本発明を説明する。

図 1 は、pyrG 遺伝子を有するプラスミド pJaL335 の作成を示す。

図 2 は、pyrG 遺伝子の 5' および 3' 配列を有するプラスミド pS05 の作成を示す。

図 3 は、pyrG コード配列が、alp 遺伝子の 5' および 3' 配列の間に挿入されたプラスミド pJaL212 の作成を示す。

図 4 は、NpI のコード配列を破壊したプラスミド pJaL399 の作成を示す。

図 5 は、カンジダ・アンタークチカ (*Candida antarctica*) のリパーゼ B の N 末端アミノ酸配列、およびこの配列に由来する 2 つのオリゴヌクレオチドプライマーの配列を示す。

図 6 は、*C. アンタークチカ* のリパーゼ B 遺伝子を有するプラスミド pMT1305 の作成を示す。

図 7 は、*C. アンタークチカ* のリパーゼ B 遺伝子の 5' 末端の部分配列を有するプラスミド pMT1329 の作成を示す。

図 8 は、*C. アンタークチカ* のリパーゼ B 遺伝子を有するプラスミド pMT1332 の作成を示す。

図9は、*C.アンタークチカ*のリパーゼB遺伝子を有する発現プラスミドpMT1335の作成を示す。

#### 発明の詳細

##### 「宿主細胞」

本発明は、異種性タンパク質の発現に有用な宿主細胞であって、

親細胞に比べて、メタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼ活性レベルが有意に低下する様に遺伝的に修飾した前記細胞を提供する。前記宿主細胞は、親細胞、例えば野生型細胞から得られる。

本発明の宿主細胞は、異種性タンパク質の発現に通常用いられる任意の宿主細胞でもよい。

本発明の宿主細胞は、好ましくは、希望するタンパク質を生産できる酵母または糸状真菌である。前記酵母は、特にサッカロミセス属 (*Saccharomyces*) の株、好ましくはサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) でよい。前記糸状真菌は、特に、アクレモニウム (*Acremonium*)、アスペルギルス (*Aspergillus*)、カンジダ (*Candida*)、コクリオボラス (*Cocliobolus*)、エンドシア (*Endothia*)、フサリウム (*Fusarium*)、ヒュミコラ (*Humicola*)、ニューロスポラ (*Neurospora*)、リゾムコール (*Rhizomucor*)、リゾプス (*Rhizopus*)、サーモミセス (*Thermomyces*)、トリコデルマ (*Trichoderma*)、ポドスポラ (*Podospora*)、ピリクラリア (*Pyricularia*)、およびペニシリウム (*Penicillium*) 属の群中から選択される菌株でよい。

好ましい実施形態では、前記糸状真菌は、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・フェニキス (*Aspergillus phoenicis*)、アスペルギルス・ジャポニカス (*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・フィータス (*Aspergillus foetus*)、フサリウム・グラミネアルム (*Fusarium graminearum*)、フサリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*)、フサリウム・ソラニ (*Fusarium solani*)、フサリウム・ベネナタム (*Fusarium venenatum*)、ヒュミコラ・グリセア (*Humicola grisea*)、ニューロスポラ・クラサ (*Neurospora crassa*)、ペニシリウム・クリソゲ

ナム(*Penicillium chrysogenum*)、リゾムコール、メイヘイ(*Rhizomucor miehei*)、トリコデルマ・レセイ(*Trichoderma reesei*)、およびトリコデルマ・ビリデ(*Trichoderma viride*)の群中から選択される菌株であり、特に、アスペルギルス・オリゼおよびアスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)の株、並びにフサリウム属の種ATCC20334である。

#### 「メタロプロテアーゼ」

本発明において、メタロプロテアーゼとは、基質のペプチド骨格を加水分解する触媒中心に亜鉛金属を含むタンパク質分解酵素である。これらのプロテアーゼは、活性中心が亜鉛であり、カルシウムに依存した活性を有するカルパインとは区別される。プロテアーゼがメタロプロテアーゼであることを確認するためには、1mM 1,10-フェナンスロリンによって中心亜鉛を除去すると、タンパク質分解活性が可逆的に欠失し、そして $Zn^{2+}$  (0.1-100mM)を滴下すると活性が回復することに依る。

好ましい実施形態では、本発明において考慮される本メタロプロテアーゼは、フサリウム属のメタロプロテアーゼ、好ましくはフサリウム・オキシスポラム(*Fusarium oxysporum*)のメタロプロテアーゼである。最も好ましい実施形態では、本メタロプロテアーゼは、配列番号1のヌクレオチド配列、またはこれに相同な配列を有するF.オキシスポラムのp45メタロプロテアーゼ(p45)である。

別の好ましい実施形態では、本発明において考慮される本メタロプロテアーゼは、中性プロテアーゼ、すなわち至適タンパク質分解活性が、中性のpH範囲で、すなわち約pH6-8の範囲で、好ましくは約pH6.5-7.5の範囲で、特にpH7付近で得られるメタロプロテアーゼである。さらに特に、本発明において考慮される本メタロプロテアーゼは、NpIまたはNpII類のアスペルギルス属の中性メタロプロテアーゼである(Tasutmi, et al., 1991)。

好ましい実施形態では、本メタロプロテアーゼは、配列番号2のヌクレオチド配列に由来するアミノ酸配列、またはこれに相同な配列からなる、A.オリゼの中



性メタロプロテアーゼI(NpI)である。

#### 「アルカリ性プロテアーゼ」

本発明において、アルカリ性プロテアーゼは、中性からアルカリ性のpH範囲内に活性のピークを有するセリンプロテアーゼである。アミノ酸配列の分析から、このアルカリ性プロテアーゼは、ズブチリシン様セリンプロテアーゼのサブグループ、サブチラーゼに相同であることが指摘される。Siezen, et al. (1991, *Protein Eng.* 4:719-737)の要約によれば、50を超えるサブチラーゼが、広範囲の様々な生物種、グラム陽性菌およびグラム陰性菌などの様々な細菌種から、真菌および酵母、さらに虫(worms)、昆虫(insects)、植物および哺乳類などの高等生物に亘って、同定されている。これらの内、40を超えるサブチラーゼについて、そのアミノ酸配列が決定されていて、そして本酵素の成熟領域の長さは、268から1775アミノ酸に広がっていること、およびN末端近傍には、27から280アミノ酸のプレプロ領域があることが示されている。真菌および酵母においては、変異は明らかに小さくて、前記の各々の領域は、真菌では、279-281および105-121であり、酵母では、297-677および126-280である。A.オリゼ由来の本アルカリ性プロテアーゼの完全なコード領域を含んだcDNA断片は、クローニングされて、*Saccharomyces cerevisiae*で発現された(Tasumi, H., et al. 1989, *Mol. Gen. Genet.* 219:33-38)。この1次構造は、他のズブチリシン配列に対して29から44%の相同性を有し、そしてズブチリシンBPN'内の活性部位の3残基Asp33, His64およびSer221は保存されていた。

好ましい実施形態では、本アルカリ性プロテアーゼは、A.オリゼのアルカリ性プロテアーゼ(alp)であり、好ましくは配列番号3の

ヌクレオチド配列、またはこの相同配列を含むcDNA配列によってコードされるものである。

#### 「配列相同性」

本文において、DNA配列の相同性は、2つの配列間の同一の程度として決定され、1つ目の配列の、2つ目の配列からの由来性を意味する。この相同性は、当業界で周知のコンピュータプログラム、例えばGCGプログラム内にあるGAP (Progr

am Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison WI, USA; Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453)によって、適切に決定することができる。DNA配列の比較では、GAPにおいて、クリエーションペナルティーを5.0、エクステンションペナルティーを0.3に設定する。類似のDNA配列のコード領域は、対象のDNA配列のコード領域に対して、好ましくは、少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも97%の同一の程度を示す。

本文において、アミノ酸配列の相同性は、同様に、2つの配列間の同一の程度として決定され、1つ目の配列の、2つ目の配列からの由来性を意味する。この相同性は、当業界で周知のコンピュータプログラム、例えば前記のGAP (Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., 1970, supra)によって、適切に決定することができる。

アミノ酸配列の比較では、GAPにおいて、クリエーションペナルティーを3.0、エクステンションペナルティーを0.1に設定する。類似のDNA配列がコードするポリペプチドは、対象のDNA配列がコードする構造タンパク質に対して、好ましくは、少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、そして特には、少なくとも97%の同一の程度を示

す。

本発明は、配列番号1、配列番号2および配列番号3に由来するアミノ酸配列を有する成熟ポリペプチドに対して、多くて3アミノ酸、好ましくは、多くて2アミノ酸、より好ましくは、多くて1アミノ酸が相違するアミノ酸配列を有する、メタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼ変異体にも向けられる。

本文において、ハイブリダイゼーションとは、類似のDNA配列が、構造タンパク質のコード領域を含む対象DNA配列によってコードされるポリペプチドに対応するオリゴヌクレオチドプローブに、以下に詳述する特異的条件下に、結合することを意味する。

ヌクレオチドプローブと、相同DNAまたはRNA配列とのハイブリダイゼーション

を決定する適当な条件は、ハイブリダイズするDNAまたはRNA断片を含んでいるフィルターを、5x SSC (standard saline citrate buffer; Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning, ColdSpring Harbor NY, USA) 中に、前もって10分間浸すこと、5x SSC, 5x Denhardt's solution, 0.5% SDS and 100  $\mu$ g/ml of denatured sonicated salmon sperm DNA (Sambrook et al. 1989, supra) 中で、フィルターを前処理すること (prehybridization)、そしてランダムプライマーで合成した<sup>32</sup>P-dCTP 標識プローブ (比活性  $>1 \times 10^9$  cpm/ $\mu$ g) (Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. 1983, Anal. Biochem. 132:6-13) を含んだ同溶液中で、12時間約45°Cで、ハイブリダイゼーションすることを含んで成る。このフィルターを、2x SSC, 0.5% SDS 中で、少なくとも55°C (低ストリンジェント)、より好ましくは少なくとも60°C (中ストリンジェント)、より好ましくは少なくとも65°C (中高ストリンジェント)、より好ましくは少なくとも70°C (高ストリンジェント)、さらにより好ましくは少なくとも75°C (最高ストリンジェント) の温度で、30分間2回、洗浄する。これらの条件下

で、このオリゴヌクレオチドプローブがハイブリダイズする分子を、X線フィルムに感光して検出する。

#### 「宿主細胞の遺伝的修飾」

本発明の宿主細胞に対して、メタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼ活性の発現レベルを有意に低下させる様に、当業界に既知の標準的な組換えDNA技術を用いて、遺伝的な修飾を施す。メタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼの各活性の原因となる遺伝子配列を、不活性化するか、あるいは、部分的にまたは完全に除去することができる。従って、本発明の宿主細胞は、低レベルまたは検出不可能なレベルのメタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼを発現するか、あるいは、機能的に不活性化したメタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼを発現する。

特定の実施形態では、前記不活性化は、注目するメタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼ遺伝子内の各構造領域または調節領域を修飾することによって得られる。既知で有用な技法には、限定しないが、特異的またはランダム突

突然変異、PCRによる突然変異、部位特異的DNAの欠失、挿入および／または置換、遺伝子破壊または遺伝子置換、アンチセンス法、あるいはこれらの組み合わせがある。

適当な物理的または化学的な突然変異誘発剤を用いて、突然変異を起こすことができる。本発明の目的に適する物理的または化学的な突然変異誘発剤の例には、限定しないが、紫外線照射、ヒドロキシルアミン、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(MNNG)、O-メチルヒドロキシルアミン、亜硝酸、エチルメタンスルホン酸(EMS)、重亜硫酸ナトリウム、蟻酸、およびヌクレオチド類似体がある。これらの試薬を用いる場合、典型的には、突然変異を誘発させる細胞を、適当な条件下に、選択した突然変異誘発剤中に放置して

、NpIおよびalpの生産が有意に低下した細胞を選択することによって、突然変異を達成する。

構造配列中、あるいは、構造配列の転写または翻訳に必要な調節エレメント中において、1つまたは複数のヌクレオチドを導入、置換または除去することによって、修飾を達成することもできる。例えば、ヌクレオチドを挿入または除去することによって、構造遺伝子において、停止コドンを導入するか、開始コドンを除くか、またはオープンリーディングフレームを変化させることができる。当業界に既知の方法に従って、部位特異的突然変異またはPCRによる突然変異を行って、構造遺伝子またはその調節エレメントの修飾または不活性化を達成することができる。原理的には、インビボで修飾を行ってもよいが、現在では、以下の実施例の様に、インビトロで修飾するのが好ましい。

選択した宿主細胞において、メタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼを不活性化するか、またはその生産を低下させる便利な方法は、遺伝子破壊の方法に基づく。この方法では、注目する内在性の遺伝子または遺伝子断片に相当するDNA配列を、インビトロで突然変異させる。その結果、このDNA配列は欠陥遺伝子となる。そしてこれを宿主細胞に導入すると、相同組換えが起きて、この欠陥遺伝子が、内在性の遺伝子または遺伝子断片に置き換わる。この欠陥遺伝子または欠陥遺伝子断片には、メタロプロテアーゼおよび／またはアルカリ性プロテ

アーゼをコードする各遺伝子が修飾または破壊された形質転換体を選択するために用いるマーカーもコードされていることが望ましい。

標的遺伝子を欠失させるか、または破壊する方法は、特に、Miller, et al (1985, Mol. Cell. Biol. 5:1714-1721); WO 90/00192, May, G. (1992, Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi, J.R. Kinghorn and G. Turner, eds., Blackie Academic and Professional, pp. 1-25); および Turner, G. (1994, Vectors for Genetic Manipulation, S.D. Martinelli and J.R. Kinghorn, eds., Elsevier, pp. 641-665) に記載されている。

あるいは、メタロプロテアーゼのコード配列、例えば配列番号1および配列番号2のヌクレオチド配列、またはアルカリ性プロテアーゼのコード配列、例えば配列番号4のヌクレオチド配列に対して、相補的なヌクレオチド配列を用いて、確立したアンチセンス法に従って、本DNA配列の修飾または不活性化を達成することができる。アンチセンス法およびその応用は、U.S. Patent No. 5,190,931 (University of New York) に詳細に記載されている。

この様な遺伝的修飾によって、本発明の宿主細胞は、有意に低レベルのメタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼ活性を発現する。好ましい実施形態では、本宿主細胞が発現している、これらのタンパク質分解活性レベルは、各々、約50%より大きく、好ましくは約85%より大きく、より好ましくは約90%より大きく、そして最も好ましくは約95%より大きく、低下する。別の好ましい実施形態では、本発明の宿主細胞において、これらのタンパク質分解活性は、任意の組み合わせで低下してよい。最も好ましい実施形態では、本宿主細胞の発現産物中に、メタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼに起因する分解活性が本質的に無い。

#### 「タンパク質の生産方法」

本発明の方法を用いると、メタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼのタンパク質分解活性が有意に低下するので、本発明の宿主細胞が合成する影響を受けやすいタンパク質産物の安定性が向上して、その収量が増加する。詳しくは、本発明の方法を用いて、メタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼ



遺伝子内にコ

ードされている構造領域および／または調節領域内において、本宿主細胞を遺伝的に修飾する。

従って、本発明の別の点は、本発明の宿主細胞において、異種性ポリペプチドなどのタンパク質を生産する方法であつて、注目するタンパク質産物をコードする核酸配列を、前記宿主細胞に導入すること、その宿主細胞を適当な培地中で培養すること、そしてそのタンパク質産物を回収することを含んで成る前記方法を提供することである。

従って、本発明の宿主細胞は、希望する産物の発現に必要な構造遺伝子領域および調節遺伝子領域を有していなければならない。この様な構造領域および調節領域の性質は、問題の産物および宿主細胞に、大きく依存する。当業者は、宿主細胞の形質転換またはトランスフェクションに関する標準的な組換えDNA技術を用いて、本発明の宿主細胞の遺伝的設計を為すことができる (Sambrook et al.)。

好ましくは、当業界に既知の方法を用いて、希望するタンパク質産物をコードするDNA断片を含む適当なクローニング媒体、すなわちプラスミドまたはベクターを導入して、本宿主細胞を修飾する。

このクローニング媒体を、自律複製するプラスミドとして、本宿主細胞に導入するか、またはその染色体に組み込ませることができる。好ましくは、本クローニング媒体は、1つまたは複数の適当な調節領域に作用可能に連結した1つまたは複数の構造領域を有する。

この構造領域とは、希望するタンパク質産物をコードする核酸配列の領域である。この調節領域とは、転写調節配列および翻訳調節配列を含むプロモーター領域、停止シグナルを含む停止領域、およびポリアデニル化領域を含んでいる。本プロモーター、すなわち選択した宿主細胞において転写活性を発揮するヌクレオチド配列は、

細胞外または細胞内タンパク質、好ましくは酵素、例えばアミラーゼ、グルコア

ミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ、オキシドレクターゼ、ペクチナーゼ、クチナーゼ、または解糖系酵素をコードする遺伝子から得ることができる。真菌宿主細胞における転写に適するプロモーターの例には、*A.オリゼ*のTAKAアミラーゼ、*A.ニガー*の中性 $\alpha$ アミラーゼ、*A.ニガー*の酸安定 $\alpha$ アミラーゼ、*A.ニガー*または*A.アワムシ* (*Aspergillus awamori*)のグルコアミラーゼ (GluA)、*A.ニデュランス*のアセトアミダーゼ、*A.オリゼ*のアルカリ性プロテアーゼ、*A.オリゼ*のトリオースリン酸イソメラーゼ、*R.メイヘイ* (*Rhizopus meiyuei*)のアスパラギン酸プロティナーゼ、および*R.メイヘイ*のリパーゼをコードする遺伝子から得られるプロモーターがある。好ましいプロモーターは、*A.オリゼ*のTAKAアミラーゼおよび*A.アワムシ*のGluAのものである。

さらに本クローニング媒体は、選択マーカー、例えば本宿主細胞の欠損を補完する産物の遺伝子、または抗生物質耐性を付与する産物の遺伝子を含んでもよい。アスペルギルス属の選択に有用な抗生物質には、例えばハイグロマイシン、フィレオマイシン (phleomycin) およびバスタ (basta) がある。アスペルギルス属に用いる選択マーカーの例には、他に、アセトアミドの利用に関与する酵素をコードする、*amdS*；ウリジンの生合成に関与する酵素をコードする、*pyrG*；アルギニンの生合成に関与する酵素をコードする、*argB*；硝酸塩の同化経路に関与する酵素をコードする、*niaD*；および、硫酸塩の同化経路に関与する酵素をコードする、*sC*、がある。さらに、同時形質転換 (co-transformation) によって選択を行ってもよく、すなわち2つのベクターの混合液によって形質転換して、選択は、その内1つのベクターのみに対して行われる。

本発明のDNA構成体、プロモーター、ターミネーターおよびその

他のエレメントの各々を連結する方法、および複製に必要な情報を含んでいる適当なクローニング媒体に、それらを挿入する方法は、当業界に周知である (Sambrook et al., 1989)。

本発明の宿主細胞を培養するために用いる培養液は、任意の適当な通常の培養液であってよく、従来技術の原理に従って調製することができる。この培養液には、好ましくは、炭素源および窒素源、並びに他の無機塩が含まれる。適当な培

養液、例えば最小培地または複合培地は、企業から入手するか、または公表されている組成 (The Catalogue of Strains, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA, 1970など) に従って、調製することもできる。

発酵に適するpHは、多くの場合、利用する宿主細胞の性質、増殖培養液の組成、目的のポリペプチドの安定性などの因子に依存するだろう。従って、任意のpHにおいて、任意の発酵工程を用いて、本発明の宿主細胞を培養してもよいが、本宿主細胞の酸性および／または中性プロテアーゼ活性が本質的に無くなるか、または少なくとも有意に低下するpHにおいて、発酵することが有利である。WO90/00192の記載の様に、発酵のpHを上げることによって、アスパラギン酸プロテアーゼ活性を無くしてもよいが、アルカリ性のpH範囲において培養した宿主細胞から得られる希望タンパク質の収量に対して、有利な効果は無い。

発酵工程のpHが、5-11の範囲内、例えば6-10.5, 7-10, または8-9.5の範囲内である場合、酸性プロテアーゼ、例えばアスパラギン酸プロテアーゼおよびセリンプロテアーゼの活性は低下するか、または阻害され、さらにpH範囲が7より高い場合には、中性プロテアーゼの活性は低下するか、または阻害されるだろう。アルカリ条件下で発酵して生産する酵素の例には、エンドグルカナーゼ、フィターゼおよびタンパク質ジスルフィドイソメラーゼがある。

しかし、アルカリ性pH条件下では、修飾されていない宿主細胞では、アルカリ性プロテアーゼ活性が維持され、その結果、目的ポリペプチド産物の分解が潜在的に起きるだろう。従って、この様な場合、アルカリ性プロテアーゼをコードする遺伝子を不活性化することが、特に有利である。

酸性、中性およびアルカリ性プロテアーゼ活性レベルは、細胞種毎に変わるので、ある宿主細胞では、本発明のアルカリ性プロテアーゼ遺伝子の不活性化は、特に有利である。例えば、A.オリゼのアルカリ性プロテアーゼ活性レベルは、A.ニガーのものより高い。

培養後、通常のタンパク質単離法および精製法によって、培養液から、希望するタンパク質を回収する。確立した精製方法には、遠心または濾過によって、培養液から細胞を分離すること、硫酸アンモニウムなどの塩によって、培養液のタ

ンパク質成分を沈殿すること、および、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー法が含まれる。

#### 「生産物」

本発明の宿主細胞によって発現される希望の最終産物、すなわち異種性タンパク質は、任意の真核生物性または細菌性のタンパク質またはペプチドでよい。

本文では、「異種性タンパク質」とは、宿主細胞に固有でないタンパク質またはポリペプチドか、固有の配列を変える様に修飾された固有タンパク質か、あるいは、固有タンパク質の発現に必要な固有の調節配列、例えばプロモーター、リボソーム結合部位などを操作するか、または組換えDNA技術によって宿主細胞を操作した結果、発現量が増加した固有タンパク質を意味する。

より特定の実施形態では、本生産物は、治療活性のあるペプチド

またはタンパク質、例えばホルモン類、特にインスリン、成長ホルモン、グルカゴンまたはソマトスタチン；インターロイキン類、特にインターフェロン；造血細胞増殖因子、特に血小板由来増殖因子(PDGF)、エリスロポエチン(EPO)またはトロンプオエチン(TPO)；プロテアーゼ、特に第VII因子、第VIII因子、ウロキナーゼ、キモシンまたは組織プラスミノゲンアクチベーター；または血清アルブミンである。

別の好ましい実施形態では、本生産物は、真菌または細菌由来の酵素である。

前記酵素は、好ましくは、グリコシダーゼ酵素、例えばアミラーゼ、特に $\alpha$ -アミラーゼ(EC 3.2.1.1)または $\beta$ -アミラーゼ(EC 3.2.1.2)；グルカン1,4- $\alpha$ -グルコシダーゼ(EC 3.2.1.3)、セルラーゼ、特にエンド-1,4- $\beta$ -グルカナーゼ(EC 3.2.1.4)またはエンド-1,3(4)- $\beta$ -グルカナーゼ(EC 3.2.1.6)；キシラナーゼ、特にエンド-1,4- $\beta$ -キシラナーゼ(EC 3.2.1.8)またはキシラン-エンド-1,3- $\beta$ -キシロシダーゼ(EC 3.2.1.32)；ポリガラクトツロナーゼ(EC 3.2.1.15)；グルコシダーゼ、特に $\alpha$ -グルコシダーゼ(EC 3.2.1.20)または $\beta$ -グルコシダーゼ(EC 3.2.1.21)；ガラクトシダーゼ、特に $\alpha$ -ガラクトシダーゼ(EC 3.2.1.22)または $\beta$ -ガラクトシダーゼ(EC 3.2.1.23)；エンドグルカナーゼ、特にエンド-1,3- $\beta$ -グ

ルカナーゼ (EC 3.2.1.39)、エンド-1,3- $\alpha$ -グルカナーゼ (EC 3.2.1.59)、エンド-1,2- $\beta$ -グルカナーゼ (EC 3.2.1.71)、またはエンド-1,6- $\beta$ -グルカナーゼ (EC 3.2.1.75)；およびセルロース-1,4- $\beta$ -セロビオシダーゼ (EC 3.2.1.91)である。

別の好ましい実施形態では、前記酵素は、脂質分解酵素、特にリパーゼ、エステラーゼ、ホスホリパーゼまたはリゾホスホリパーゼである。

別の好ましい実施形態では、前記酵素は、フィターゼ、特に3-フィターゼ (EC 3.1.3.8)または6-フィターゼ (EC 3.1.3.26)である。

別の好ましい実施形態では、前記酵素は、タンパク質分解酵素である。

別の好ましい実施形態では、前記酵素は、ラッカーゼ、ペクチナーゼまたはクチナーゼ、あるいはオキシドレダクターゼ、例えばペルオキシダーゼである。

別の好ましい実施形態では、本生産物は、ハイブリッドポリペプチド、好ましくは、プロキモシンおよびプロトリプシン様プロテアーゼである。

メタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼ活性が欠損することから、本宿主細胞によって発現される本異種性タンパク質は、前駆体タンパク質、例えばチモーゲン、ハイブリッドタンパク質、プロ配列またはプレプロ配列として得られるタンパク質、あるいは他の任意の未成熟な型のタンパク質でもよい。

#### 実施例

本発明を、以下の実施例を参考にして、さらに説明する。これらの実施例は、本発明の範囲を限定するものではない。

#### 材料および方法

##### 「菌株」

アスペルギルス・オリゼ IF04177 :発酵研究所 (Institute for Fermentation) (大阪市淀川区十三本町2丁目17-15)から入手可能。

フサリウム・オキシスポラム DSM2672 :ブタペスト条約に従い、Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) (Mascheroder Weg 1b, DE-3300 Braunschweig, Germany)に、1983年6月6日に寄託済み。

HowB101 : この株の作成は、実施例1に記載されている。



JaL125 : この株の作成は、実施例 1 に記載されている。

JaL151 : この株の作成は、実施例 1 に記載されている。

JaL228 : この株の作成は、実施例 1 に記載されている。

#### 「遺伝子」

alp : この遺伝子は、配列番号 3 に示したアルカリ性プロテアーゼをコードする。

NpI : この遺伝子は、配列番号 2 に示した中性メタロプロテアーゼ I をコードする。

pyrG : この遺伝子は、ウリジン生合成に関与する酵素、オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼをコードする。

p45 : この遺伝子は、配列番号 1 に示した中性メタロプロテアーゼ I をコードする。

#### 「プラスミド」

pS02 : この調製は、実施例 1 に記載されている。

pS05 : この調製は、実施例 1 に記載されている。

pSRe403 : この調製は、実施例 1 に記載されている。

pSRe403 ΔSacII : この調製は、実施例 1 に記載されている。

pJaL173 : この調製は、実施例 1 に記載されている。

pJaL212 : この調製は、実施例 1 に記載されている。

pJaL335 : この調製は、実施例 1 に記載されている。

pJaL389 : この調製は、実施例 1 に記載されている。

pJaL399 : この調製は、実施例 1 に記載されている。

pToC65 : この調製は、EP531 372Bに記載されている。

pToC68 : この調製は、W091/17243に記載されている。

pToC90 : pUC19ベクター (Yannisch-Perron et al., 1985, GENE 33:10

3-119) 上に、アスペルギルス・ニデュランスのamdS遺伝

子を2.7kbのXba I断片として含んでいるp3SR2のサブクローン (Corrick et al., 19

87, GENE 53:63-71) であり、この調製は、W091/17243に記載されている。

- pDM115: この調製は、実施例1に記載されている。
- pMT1303: この調製は、実施例2に記載されている。
- pMT1305: この調製は、実施例2に記載されている。
- pMT1329: この調製は、実施例2に記載されている。
- pMT1330: この調製は、実施例2に記載されている。
- pMT1332: この調製は、実施例2に記載されている。
- pMT1335: この調製は、実施例2に記載されている。

#### 「タンパク質分解酵素の活性測定法」

メタロプロテアーゼ活性は、前もって0.1M Tris, 2mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7 中で、25℃で30-60分間トリプシンと混合した後に、そのトリプシン活性の減少として測定する (pHがより低い範囲では、100mMホウ酸塩, 10mM DMG, 2mM CaCl<sub>2</sub> から成る緩衝液を用いる)。トリプシン活性は、マイクロタイタープレート上で測定した。サンプル100μlを、100μlのL-BAPNA基質 (87mg/[μl DMSO]の保存液 (Sigma Aldrich Corp., St. Louis MO, USA) を緩衝液で50倍希釈したもの) に混合して、Thermonix microplate reader (Molecular Devices Corp., Sunnyvale CA, USA) で、405nmの吸光度を測定する。

アルカリ性プロテアーゼ活性は、反応液 1 ml (20mM Tris-HCl) 中で、合成基質N-スクシニル-Ala-Ala-Pro-Phe-p-ニトロアニリド (Sigma Aldrich Corp.) 1mMを用いて、25℃で測定する。p-ニトロアニリンの遊離を、410nmで測定する (Ramesh, M. V, et al., Infection and Immunity 62:79-85, 1994)。

#### 実施例 1

##### 「アスペルギルス・オリゼのアルカリ性プロテアーゼ (alp) 遺伝子

およびアスペルギルス・オリゼの中性メタロプロテアーゼ I (NpI) 遺伝子のゲノム欠損」

A.オリゼのpyrG<sup>-</sup>株において、A.オリゼのpyrG遺伝子を選択マーカーとして用い、2回連続して一段階遺伝子置換法を行い、alp遺伝子およびNpI遺伝子を各々欠失させる (Miller, B.L., et al., 1985, Mol. and Cell. Biol. 5:1714-1721, and May, G., in Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi, pp. 1-25, J.R. Kingho

rn and G.Thrner ,eds.:Blackie Academic and Professional,1992)。

#### 「A.オリゼのpyrG遺伝子のクローニング」

A.ニガーのpyrG遺伝子をハイブリダイズさせて、A.オリゼのpyrG遺伝子をクローニング化した(van Hartingsveldt,W.,etal.,1987,Mol.Gen.Genet.206:71-75)。Sau3Aで部分切断したA.オリゼ IF04177のDNAから作成したラムダファージライブラリーを、A.ニガーのpyrG遺伝子由来の1 kb DNA断片をプローブとして、低ストリンジェントな条件下にスクリーニングした。1つの陽性クローンのDNAを、pUC118ベクターにサブクローニングした。A.ニガーのpyrG変異株に対する補完から、できたプラスミドpS02に、前記pyrG遺伝子が含まれることが示めされた。

#### 「pyrGプラスミドpJaL335の作成」

A.オリゼのpyrGコード配列の5'末端の上流479ヌクレオチドに位置する431bp断片を、次の2つのプライマーを用いてPCRで増幅した。

プライマーA:5'-GGAGGAAGATCTCTCTGGTACTCTTCGATCTC-3' (配列番号4)

プライマーB:5'-GGAGGAGAATTCAAGCTTCTTCTACATCACAGTTTGAAAGC-3' (配列番号5)

下線領域は、A.オリゼのpyrG遺伝子の5'領域に存在する配列を示

す。各プライマーの5'末端部分に制限部位を挿入した。プライマーAは、BgIII部位を、プライマーBは、HindIII制限部位の隣にEcoRI部位を含む。

PCR反応の鋳型として、プラスミドpS02を用いた。反応条件は、反応緩衝液100  $\mu$  l (50mM KCl, 10mM Tris-HCl,pH8.0, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>)中に、Taqポリメラーゼ2.5単位、pS02 1000ng、各dNTP 250nM、前記各プライマー10pmolが含まれた。

増幅反応は、Perkin-Elmer Centus DNA Thermal 480を用いて、94℃ 3分間反応後、94℃ 1分間、55℃ 30秒間、72℃ 1分間を1サイクルとして、25サイクル行った。このPCRによって、長さ430bpの単一DNA断片が生成した。この断片をBgIIIおよびEcoRIによって切断した後、ゲル電気泳動で分離し、精製し、プラスミドpS02のBgIII/EcoRI部位にクローニングして、プラスミドpJaL335を作成した。従って、pJaL335は、2つの431bp断片に挟まれたpyrG遺伝子を有する。図1は、pJaL335の作成工程を示す。

## 「pyrG欠損プラスミドpS05の作成」

プラスミドpS02をNhe Iで切断し、pyrG遺伝子の約1.1kbのコード配列を除去した後に、再連結して、pyrG欠損プラスミドpS05を作成した。これには、pyrG遺伝子の5'側および3'側の各1 kbのフランキング配列が残っている。図2に、この作成を示す。

## 「A.オリゼのpyrG-株HowB101の作成」

pS05から得た、A.オリゼのpyrG遺伝子の5'側および3'側フランキング配列を含む2.2kbHind III断片によって、A.オリゼ IF04177を形質転換した。pyrG変異体を選択するために、5-フルオロオロト酸耐性の表現型によって、形質転換体を選択した。サザン分析によって、1個の変異体HowB101が、A.オリゼのpyrGの遺伝子座に期待された欠損を有することが分かった。HowB101はウリジン依存性であるので、野生型pyrG遺伝子によって形質転換された株を、ウリジン非存在下の生育能によって選択することができる。

## 「alp遺伝子欠損プラスミドpJaL212の作成」

Sau3Aで部分切断したA.オリゼ IF04177のDNAから、ゲノムDNAライブラリーを作成した。これらの断片を、BamHIで切断したpUC19に連結した。A.オリゼのアルカリ性プロテアーゼの既知のタンパク質配列断片に相補的な縮重オリゴヌクレオチドプローブによって、このライブラリーをスクリーニングした。この結果、3.9kbのSau3A断片を含んだプラスミドpSRe403が得られた。

pSRe403をSac IIで切断してから、再連結することによって、alp遺伝子の約1 kb断片が除かれたプラスミドができた。これをpSRe403 Δ Sac IIとした。

pSRe403 Δ Sac IIを、Hind IIIによって部分的に切断し、この末端を、クレノーポリメラーゼによって平滑化した。その後、これを再連結し、pUC19配列内のHind III部位を除いた。できたプラスミドをpJaL173とした。

pS02をHind IIIで切断し、pyrG遺伝子を含んだ3.8kb断片を得た。この断片を、pJaL173のHind III部位に挿入して、プラスミドpJaL212を作った。このプラスミドでは、pyrG遺伝子Hind III断片が、その上流および下流で、各々、alp遺伝子の5'および3'配列に挟まれている。

## 「A.オリゼのalp 株JaL125の作成」

pJaL212から得た6.8kbのSac I/Sph I断片によって、標準的方法で、HowB101を形質転換した。この断片は、alpのプロモーター1.5kb、pyrG遺伝子、およびalp遺伝子の3'ターミネーター1.5kbから成る。この形質転換体を、ウリジン非存在下の生育能によって選択した。

pJaL173から得た、alp遺伝子部分を含む599bpのPst I/Sac II断片を放射性標識し、これをプローブとしてサザンブロットを行い、これらの形質転換体を分析した。野生型では1.0kbのPst Iバンドが、alp遺伝子の欠損を有する株では、1.9kbにシフトすることによって、形質転換体を選択した。この様な形質転換体が4個同定され、この内の1個をJaL125とした。

## 「A.オリゼのNp I遺伝子のクローニング」

SuperCos1 Cosmid Vector Kit(Stratagene, Inc., La Jolla, CA, USA)を用いて、その説明書どおりに、A.オリゼのコスミドライブラリーを作成した。

A.オリゼ IF04177のゲノムDNAを、標準的な方法によって単離したプロトプラストから調製した(Christensen, T., et al., 1988, Biotechnology 6:1419-1422)。単離した後に、Labufuge T(Heto)によって、2500rpmで5分間遠心し、そのプロトプラストを沈殿させた。このペレットを、緩衝液(10mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA)中に懸濁し、これを100 µg/mlプロテアーゼKおよび0.5% SDSで処理した。DNA調製のためのこの工程および次の全ての工程は、SuperCos1 Cosmid Vector Kitの推奨方法に従って行った。

CHEFのゲル装置(BioRad, Hercules, CA, USA)を用いて電気泳動を行い、ゲノムDNAのサイズを分析した。簡単には、1%アガロースゲルを用いて、20時間、200ボルト、10-50秒パルスの条件で行った。ゲルをエチジンプロマイド染色し、紫外線照射下に写真撮影したところ、長さが50から100kb以上の範囲のDNAが認められた。このDNAを、Sau3Aで部分切断した。得られたDNA断片のサイズは、CHEFゲル分析から、20から50kbまでの範囲であった。

塩化セシウム勾配中で形成されたバンドから、SuperCos1ベクターを調製し、連結し、前記キットの方法に従ってパッケージングした



。このライブラリーの力価を決定した後に、1回の連結およびパッケージングから得たパッケージング混合液全部を、前記キットの宿主細胞XL1-BlueMRにトランスフェクションした。これを、50  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含んだLBプレートにまいた。約3800個のコロニーが得られた。10個のコロニーから調製したコスミドを分析したところ、その全てに、期待されたサイズの挿入配列が認められた。コロニーを個別に取り上げ、ウエルあたり100  $\mu$ lのLB(100  $\mu$ g/mlのアンピシリン含有)が入った96ウエルのマイクロタイタプレートに接種して、これを37℃で一晩培養した。50%グリセロール100  $\mu$ lを各ウエルに加え、全ライブラリーを-80℃で凍結した。全部で3822個のコロニーを保存した。これは、A.オリゼのゲノムが約4.4倍増幅されたことになる。

#### 「フサリウム・オキシスポラムのp45メタロプロテアーゼのプロープの調製」

W095/30757 (Novo Nordisk Biotech, Inc., published 16 November 1995)に開示された通りに、フサリウム・オキシスポラムのp45メタロプロテアーゼ遺伝子をクローニングした。

cDNAライブラリーから選択された1つのクローンを、pDM115とした。pDM115は、F.オキシスポラムのp45遺伝子部分をコードする1.76kbのcDNA断片を含み、このプラスミドからプロープを調製した。このプラスミドをSalIで切断し、この断片を1%アガロースゲルで分離した。注目した1.5kbバンドから、DNA断片を抽出した。この断片を、ランダムプライマーを用いて<sup>32</sup>P-dATPで標識し、これを、サザン分析およびA.オリゼコスミドライブラリーのスクリーニングのために、プロープとして用いた。

#### 「A.オリゼライブラリーのスクリーニング」

F.オキシスポラムのp45プロープによって、A.オリゼコスミドラ

イブラリーをスクリーニングするために、このライブラリーの個別の凍結コロニーを、LBプレート(100  $\mu$ g/mlのアンピシリン含有)上に、96ウエルプレート用の6列8ピンの器具を用いて接種した。ライブラリーの全コロニーを含む全プレートを、37℃で一晩培養した。プレートの大きさに切った滅菌濾紙(Whatman 540)をコロニー上にのせ、さらに2時間37℃で培養した。次の日、その濾紙を、0.5

MNaOHで5分間2回、次に0.5M Tris-HCl(pH.4)で5分間2回、最後に2x SSCで5分間2回、洗浄した。この濾紙をエタノールにつけ、空气中で乾燥させた。

pDM115から得た1.5kbの32P標識DNA断片を用いて、この濾紙をハイブリダイズした。ハイブリダイゼーション緩衝液(10x Denhart's solution, 5x SSC, 0.02M EDTA, 1% SDS, 0.15mg/ml polyA-RNA & 0.05mg/ml yeast RNA)中で、65℃16時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後に、この濾紙を、2x SSC, 0.1%SDS、65℃で2回洗浄し、そしてX-線フィルムに感光した。3個のコロニーが、本プローブにハイブリダイズした(3E8, 3C1, 2A5)。

#### 「前記コスミドクロンの特性」

制限酵素解析から、前記3個のコスミドクロン中2個3E8および3C1には、A.オリゼのゲノムの同一領域に由来する挿入配列が含まれていた。コスミドDNA 3  $\mu$ gをEcoRIで切断し、アガロースゲル電気泳動で分画した。そのDNAを、Immobilon-N膜フィルター(Millipore)に転写し、放射性標識したpDM115プローブを用いてハイブリダイズした。その結果、両コスミドクロンにおいて、4 kbのEcoRI断片がハイブリダイズした。この4 kbのEcoRI断片をさらに解析した。

#### 「NpI欠損プラスミドpJaL399の作成」

EP531 372に開示されているプラスミドpToC65を、SacIで切断し、5'末端のリン酸基を除くために細菌性アルカリホスファターゼ(Boehringer Mannheim)で処理し、フェノール抽出し、そして沈殿した。コスミドクロン3E8から得たA.オリゼのNpI遺伝子を含んだ5.5kbのSacI断片を、ゲル電気泳動で単離し、精製した。前記の2つの断片を混合して、連結した。これによって大腸菌を形質転換した後、調製したプラスミドの制限酵素解析を行い、適切なプラスミドを有する大腸菌コロニーを同定した。得られたプラスミドをpJaL389とした。このサブクロン部分のDNA配列解析から、A.オリゼのNpI遺伝子のコード領域の存在を確認した。

プラスミドpJaL389をBamHIで切断して、NpI遺伝子内部の1.1kb断片を除いた。残りの7.1kb断片をクレノーポリメラーゼ処理して、末端を平滑化し、ゲル電気泳動で分離し、精製した。次に、このDNA断片を、細菌性アルカリホスファター

ぜ処理し、フェノール抽出し、そして沈殿した。プラスミドpJaL335をHindIIIで切断して、A.オリゼのpyrG遺伝子を含んだ3.5kb断片を得た。前記の2つの断片を混合して、連結した。これによって大腸菌を形質転換した後に、調製したプラスミドの制限酵素解析を行い、適切なプラスミドを有する大腸菌コロニーを同定した。図4に、このプラスミドpJaL399の作成を示す。

従って、プラスミドpJaL399は、pToC65ベクター内のNpI遺伝子内部の1.1kbのBamHI断片を、A.オリゼのpyrG遺伝子をコードする3.5kbDNA断片で置換したものである。

#### 「A.オリゼのpyrG<sup>-</sup>株JaL151の単離」

A.オリゼのalp<sup>-</sup>株JaL125をスクリーニングして、自発的に5-フルオロオロト酸耐性になったpyrG変異株を同定した。この1つの株JaL151が、alp<sup>-</sup>およびpyrG<sup>-</sup>であることを確認した。HowB101同

様に、JaL151は、ウリジン依存性であるので、野生型pyrG遺伝子によって形質転換された株を、ウリジン非存在下の生育能によって選択することができる。

#### 「A.オリゼのNpI<sup>-</sup>株JaL228の作成」

標準的な方法で、pJaL399の7.9kbのSacI断片によって、JaL151を形質転換した。この形質転換体を、ウリジン非存在下の生育能によって選択した。再度選択してから、その12個の形質転換体から、染色体DNAを調製した。pJaL389から得た、NpI遺伝子を含む5.5kbのSacI断片を<sup>32</sup>P標識したものをプローブとして、各形質転換体のDNAをBamHIで切断したものをサザンブロットで分析した。ハイブリダイゼーション後に、1.1kbのBglII断片のバンドが表れないこと（NpI遺伝子の破壊を意味する）、および5'および3'フランキング配列の移動度が変化することによって、目的の株を同定した。これらの形質転換体の中の1つの株を、JaL228とした。

## 実施例2

#### 「C.アンタークチカのリパーゼBのクローニング」

カンジダ・アンタークチカのゲノムをSau3Aで部分切断し、pBR322を用いてゲノムライブラリーを調製した。CLB(C.antarctica lipase B)のN末端アミノ酸配

列から設計した2つのオリゴヌクレオチドプローブ、NOR929（配列番号4）およびNOR930（配列番号5）によって、複製フィルターをスクリーニングした（図5）。8個のコロニーが同定された。プラスミド解析から、挿入配列の重複が認められた。7.8kbの挿入配列を含んだプラスミドpMT1303を、さらに解析した。そこからSalI断片を除いて、2.1kbの挿入配列を有するプラスミドpMT1305を作成した（図6）。NOR929をプライマーとしてpMT1305の配列を決定し、CLBがコードされていることを確認した。Promega Erase-a-Base system (Promega Corp., Madison WI, USA

）を用いて、pMT1305から連続的な欠失配列を作成し、両ストランドの全長の遺伝子配列を決定した。配列番号6に、そのコード配列を示す。

#### 「部分的CLBを含むプラスミドpMT1329の作成」

pMT1305から、CLBのN末端配列をコードする788bpのSalI/HindIII断片を単離した。この断片から、2つの小断片170bpのHindIII/BanI断片および204bpのBanI/Sau3A断片（Sau3A末端は平滑化した）を単離した。これらの2つの断片を、EcoRV/HindIIIで切断したプラスミドpIC19Rにクローン化した。これによって、CLBの開始コドンの9bp隣の位置において、平滑化したSau3AとEcoRVが連結して、BgII部位になった。このプラスミドをpMT1329とした（図7）。

#### 「部分的CLBを含むプラスミドpMT1332の作成」

pMT1305から、CLBのC末端配列をコードする670bpのHindIII/XmnI断片を単離し、HindIII/NruIで切断したプラスミドpIC7にクローン化した。これをpMT1330とした。pMT1329からの3.0kbのHindIII/NarI断片、およびpMT1330からの0.7kbのHindIII/ClaI断片を連結して、CLBの完全な遺伝子を形成させたプラスミドpMT1332を作成した（図8）。

#### 「CLB発現プラスミドpMT1335の作成」

発現ベクターpToC68を用いて、アスペルギラス属において、clb遺伝子を発現させた。pMT1332からの1kbのBclI/BglII断片を、BamHIで切断したpToC68に挿入して、pMT1335を作成した（図9）。真菌においてC.アンタークチカのリパーゼBを発現させるためのベクターとして、プラスミドpMT1335を作成した。

「A.オリゼ株における、C.アンタークチカのリパーゼBの発現」

pMT1335およびpToC90の2個のプラスミドによって、A.オリゼ株

IF04177およびJaL228を各々同時形質転換した。

10mMアセトアミド含有の最小培地中での増殖能によって、形質転換体を選択し、さらにCLBの生産能によって、pMT1335を含んだ形質転換体を選択した。A.オリゼの野生株 IF04177およびalp-,NpI-株JaL228の形質転換体から各々1個を選択し、93時間タンク発酵させた。分生子を、1.2Lの20%マルトース液と8%尿素の混合液を含んだKeiler発酵槽(2L)に接種した。20%マルトース液と8%尿素の混合液を連続的に供給した。pHを7に維持するために必要なリン酸を追加した。

以下の表1で、JaL228におけるCLB活性の収量と、IF04177における収量とを比較した。ここで1リパーゼ単位(LU)は、pH7.0、30℃の条件下で、トリブチリンから1分間に1  $\mu$ molのブチル酸を遊離させるために必要な酵素量と定義する。この表から、JaL228での生産量は、IF04177の生産量より1.8倍多いことがわかり、alp遺伝子およびNpI遺伝子を欠失させると、これらのプロテアーゼ活性で切断されやすいタンパク質の安定性を有意に向上させることができることが証明された。

表1

93時間タンク発酵後の、IF04177およびJaL228によるCLB生産量

時間	IF04177(LU/g)	JaL228(LU/g)
93	575	1041



## 配列表

## (1) 一般情報:

(ii) 発明の名称: 新規な宿主細胞およびタンパク質生産方法

(iii) 配列の数: 6

## (2) 配列番号1の情報:

## (i) 配列特性:

(A) 長さ: 2052塩基対

(B) 型: 核酸

(C) スtrand: 1 本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(ii) 分子型: ゲノムDNA

## (vi) 起源:

(A) 生物: *Fusarium oxysporum*

(B) 株: DSM2672

(C) 単離体: p45

## (ix) 特徴:

(A) 名称/キー: mat ペプチド

(B) 位置: 785..2049

## (ix) 特徴:

(A) 名称/キー: sig ペプチド

(B) 位置: 55..784

## (ix) 特徴:

(A) 名称/キー: インترون

(B) 位置: 364..415

## (ix) 特徴:

(A) 名称/キー: インترون

(B) 位置: 802..854

(ix) 特徴：

(A) 名称／キー：イントロン

(B) 位置：1821..1868

(xi) 配列記載：配列番号 1：

ATGCGTTTCT CCGACTCTCT CCTCCTCATC GGCCTATCCA GCCTCGCTGG TGCTCATCCC	60
AGCAGAAGGG CTCCTAATCC TTCACCGCTG AGCAAGCGTG GCCTCGACCT GGAAGCTTTT	120
AAGCTTCTCT CCATGGCCGA GTACGTCTCT CAGGACGAGG TTCCTGATGA TGTCAGTGCC	180
AAGGTCGTCA CCAAGCGCGC TGATTACACC GAGACTGCCA AGGACTTGGT TAAGTCGACT	240
TTCCCAAGG CTACTTTCCG TATGGTCACG GATCACTATG TTGGTAGCAA CGGAATTGCG	300
CATGTAACT TTAAGCAGAC TGTCAACGGT ATTGATATCG ACAATGCTGA TTTCAACGTC	360
AACGTGGGTA TTCTCAAGAC TTTGGGGAGT TTGGAATGTG CTGACATGGA TACAGATTGG	420
CGCTGACGGC GAGGTCTTCT CCTACGAAA CAGCTTCTAC GAGGGCAAGA TTCCCGGTCC	480
TCTTACCAAG CGTGACGAGA AAGACCCCGT CGACGCTCTC AAGGACACCG TTGATGTTCT	540
TTCTCTCCCC GTTGAGGCTG ACAAGGCCAA GGCTGAGAAG AAGAGCAAGA ACCACTACAC	600
CTTCACTGGT ACCAAGGGTA CCGTCAGCAA GCGCGAGGCT AAGCTCACCT ACCTTGTTGA	660
TGAGAACAAG GAGCTCAAGC TCACATGGAG AGTTGAGACT GATATTGTTG ACAACTGGCT	720
GTTGACTTAT GTCAATGCTG OCAAGACTGA TGAGGTTGTT GGTGTTGTTG ACTACGTCAA	780
TGAGGCGACA TACAAGGTCT AGTACGTATT TCCATAAATT GACGATTGGG AAAGAATTGA	840
CCGTTGTATT ATAGTCCTTG GGGTGTCAT GATCCCTCCA AGGGATCTCG CTCCACTGTT	900
GAGAACCCTT GGAATCTCGC GGCTCCGAG TTCACTGGC TCAGCGACGG CTCAAACAAC	960
TACACCACAA CCCGCGGGAA CAATGGAATT GCACAGGTGA ATCCTTCAGG GGGCTCCACG	1020
TATCTGAACA ATTACCGTCC TGATAGCCCG TCGCTGAAGT TCGAGTATGA TTAATCCACC	1080
AGCACCCTA CACCCACCAC CTACCGCGAT GCTTCCATCG CTCAGCTTTT CTACACAGCC	1140
AACAAGTACC ACGACCTCCT CTACCTTCTT GGCTTTACCG AACAGGCTGG TAACTTCAG	1200
ACCAACAACA ATGGCCAGGG TGGTGTAGGA AACGATATGG TTATCCTCAA CGCTCAGGAC	1260
GGAAGCGGCA CCAACAACGC CAACTTCGCT ACACCCGCTG ACGGTCAGCC CGGCCGCATG	1320
CGAATGTATC TCTGGACATA CAGCACACC CAGCGTGAAT GCAGTTTCGA CGCTGGCGTT	1380

GTTATCCACG AGTACACTCA CGGTCTCTCC AACCGTCTCA CAGGTGGCCC TGCCAACTCG	1440
GGTTGTCTTC CCGGTGGTGA ATCCGGTGGC ATGGGTGAGG GCTGGGGTGA CTTCATGGCT	1500
ACTGCCATTG ACATCCAATC CAAGGATACC CGCGCTAGCA ACAAGGTCAT GGGTGA CTGG	1560
GTGTACAACA ACGCAGCTGG TATCCGAGCT TATCCTTACA GTACAAGCCT TACCACTAAC	1620
CCTTACACTT ACAAGAGTGT TAACAGTCTC AGTGGAGTCC ATGCTATTGG TACTTACTGG	1680
GCTACTGTTC TGTATGAGGT TATGTGGAAC CTCATCGACA AGCATGGGAA GAATGATGCG	1740
GATGAGCCCA AATTCAACAA CGGCGTTCCT ACAGATGGCA AATATCTTGC TATGAAGTTA	1800
GTAGTGGATG GCATGTCGCT GTAAGTTGTC CCTTGGATTT GTAGGAGTTC TTATCTAACC	1860
TTTAATAGGC AACCTTGCAA CCCCAACATG GTCCAGGCCC GAGACGCCAT CATCGACGCC	1920
GACACCGCTC TTACCAAGGG AGCTAACAAG TGCAGATCT GGAAGGGCTT TGCCAAGCGT	1980
GGTCTTGGA CTGGTGCCAA GTATAGTGCT TCCAGCCGTA CTGAGAGCTT TGCTCTTCCT	2040
TCTGGATGTT AA	2052

(2) 配列番号2の情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 2968塩基対

(B) 型: 核酸

(C) ストランド: 1本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(ii) 分子型: ゲノムDNA

(vi) 起源:

(A) 生物: *Aspergillus oryzae*

(B) 株: IF04177

(C) 単離体: NpI

(ix) 特徴:

(A) 名称/キー: エキソン

(B) 位置: 458..817

(ix) 特徴:

(A) 名称／キー：エキソン

(B) 位置：868..1262

(ix) 特徴：

(A) 名称／キー：エキソン

(B) 位置：1320..1870

(ix) 特徴：

(A) 名称／キー：エキソン

(B) 位置：1930..2344

(ix) 特徴：

(A) 名称／キー：エキソン

(B) 位置：2404..2587

(xi) 配列記載：配列番号2：

CCCCGATTG GGAAGACCTT GAATCCAATC TATCGGAGAG CCGACGGAAC GGGTTTTCTT	60
GAACCCAATG TCCCAATTGC TTTGAGAAAA TGGATATTAT TCAATGCCCC TGATCATTAT	120
TGGCATACTC TTCACGGAGT GGTCTGCCCC TGGGCGATTG CTCCACCATG AGGTGCATGA	180
AGGTAACCCC GAGCTGCTAT AGATGAAGTG TGTCGGATAT TGCAGGAGTC TGAATGCGCA	240
GCTGATTGCC CTTTTCACCAT CATGATGAAT GGGACACAAT ATGTCTAGCT CCGGGTTGTC	300
TCGGGCCAAG AAGAAATGCT TCTTTGCGTT GATCCAGCGC GTCGAAATCT CCAATTGAAC	360
CGGTATAAAT AACAGCTGAG CGTCGCAGCA TTCAAGGCAG AACCATTCCA CAGATCATCT	420
TCTATCATTT GCATTGAGTC CAACGCCCTG GCAGTTCATG ATGCGGGGTC TTCTACTAGC	480
TGGAGCCCTT GGCCTACCTT TGGCCGTCCT TGGCGATCCG ACCCATCATG CACATGGACT	540
TCAACGTCCG ACAGTTGACT TGAATCATT CCGTTTGCAC CAGGCAGCGA AGTATATCAA	600
TGCGACTGAG TCTTCGAGTG ATGTTTCATC TTCTTTCTCT CCCTTCACCG AGCAAAGCTA	660
CGTGGAGACG GCCACTCAGC TCGTGAAGAA TATCCTGCCA GATGCTACCT TCCGTGTCGT	720
CAAGGATCAT TACATTGGTA GCAATGGGGT CGCTCATGTC AATTTTCGTC AGACGGTCCA	780
TGGCCTTGAC ATTGACAATG CGGACTTCAA TGTCATGTA CGCTGCAGTC CACCTATACT	840
ATGTTCCGGT CTAACCACTT CATTTAGGTT GGGAAAAATG GAAAGATCTT TTCCTATGGC	900

CACTCATT TT ATACGGGCAA AATCCCCGAT GCCAATCCTT TGACGAAGCG GGATTATACC	960
GACCCTGTAG CGGCTCTCAG AGGAACCAAC GAAGCTTTAC AGCTTTCTAT CACTCTAGAT	1020
CAAGTGTCTA CTGAGGCTAC CGAGGACAAA GAGTCCTTCA ATTTCAAGGG AGTCTCTGGC	1080
ACCGTTTCGG ATCCCAAGGC TCAGTTGGTC TACTTGGTAA AGGAAGATGG CAGCCTTGCT	1140
TTGACCTGGA AGGTGGAGAC AGATATTGAC AGCAACTGGC TGTTGACCTA CATCGATGCC	1200
AATACCGGCA AAGATGTCCA TGGTGTGGTT GACTACGTAG CCGAGGCAGA TTACCAAGTA	1260
TAGTGAGTAT TTTAAGAATG TGACTTGGAC TGTAGAATGA AGCTGACACA CCACCACAGT	1320
GCATGGGGTA TTAATGATCC CACGGAGGGC CCTCGCACCG TCATCAGCGA TCCATGGGAT	1380
TCGTCCGCAT CTGCGTTCAC CTGGATCAGT GACGGAGAAA ACAACTATAC CACAACTCGC	1440
GGCAACAACG GTATCGCGCA GTCGAACCCT ACCGGTGGAT CGCAGTACTT GAAGAACTAC	1500
CGGCCTGATA GCCCCGATTT GAAATTCCAA TACCCCTATT CGCTCAACGC CACACCCCCA	1560
GAGTCCTATA TTGATGCGTC TATCACTCAG CTTTTCTACA CTGCCAACAC GTACCACGAC	1620
CTACTCTACA CTCTGGGCTT CAACGAGGAG GCCGGTAATT TCCAGTACGA TAACAATGGA	1680
AAAGGAGGTG CTGGAAACGA CTACGTGATC CTCAATGCTC AGGACGGTTC TGGCACCAAT	1740
AACGCCAACT TCGCTACGCC CCCGGATGGA CAGCCCGGCC GCATGCGCAT GTACATTTGG	1800
ACCGAGTCCC AGCCTTACCG TGACGGCTCC TTCGAGGCTG GTATTGTGAT TCACGAGTAT	1860
ACTCACGGTC GTATGTATCC CTTATGAACC CCAAGATAAG GCAGTCTGAA CTAACACCAT	1920
GGTACACAGT CTCTAACCGG CTCACTGGAG GACCTGCTAA CTCTCGCTGC TTGAATGCCC	1980
TTGAATCCGG CGGAATGGGT GAAGGTTGGG GAGACTTCAT GGCCACGGCA ATTCGGCTCA	2040
AGGCCGGCGA TACTCACTCG ACCGATTATA CCATGGGTGA ATGGGCTGCA AACAAGAAAG	2100
GTGGCATCCG TGCTTACCCA TTCTCAACCT CCCTGGAAAC CAACCCTCTC ACCTACACCA	2160
GTCTCAATGA ATTGGACGAA GTGCATGCCA TCGGCGCGGT GTGGGCTAAC GTATTGTACG	2220
AGCTGTTGTG GAACTTGATC GATAAGCACG GCAAGAATGA CGGGCCAAAG CCCGAGTTCA	2280
AGGATGGAGT TCCGACTGAC GGCAAGTATC TCGCCATGAA GCTGGTGATT GATGGCATAG	2340
CATTGTAAGT GCCAACCTCG TTTCCTCTTT CTACCTATCG CAGGGGCTAA CCTTGACTTT	2400
TAGGCAACCT TGCAACCCCA ACTGTGTCCA GGCTCGCGAC GCCATCCTCG ATGCCGATAA	2460
GGCTCTCACC GATGGTGCTA ACAAGTGCGA GATTTGGAAG GCGTTTGCTA AGCGTGGTTT	2520



GGGTGAAGGC GCTGAATACC ATGCGTCTCG TCGGGTGGGC AGTGATAAGG TGCCCTCTGA	2580
TGCTTGCTAG AGTTTGTGTA TATTCTTTCA GCTAGGTGAT TGGGGAGATC CTGTAGGCTG	2640
ACTATAGTTT GAATTTAACA ACATTTCTTA ATTCTTACTG TCAGGTAAC TGCAC TGCAC	2700
AATAGCATGA ATAGGTTATG GCACTCTGGC CCTTATGTCG GATTCTACA CAATGATTTG	2760
TCCTTAAGAA ATACTATCTC AACTCATCAC CCCTCTCATC GTCCGCCGCT TCGAATTCAG	2820
GGTCATTCTT CCCCCTCTTC CTGGCCCCCT TGGCCGTCCT GACCCCTCTGC TTGCTCTCCA	2880
TCTCCCCCTC CACCCTGATC ATAGGTCACG GTGGCCGCCG GTCCCACCAG GTGGTTGGGG	2940
CAATAGTTGT TTATAGCACG GGGCTGCT	2968

(2) 配列番号3の情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 3922塩基対

(B) 型: 核酸

(C) スtrand: 1本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(ii) 分子型: cDNA

(vi) 起源:

(A) 生物: *Aspergillus oryzae*

(B) 株: A01560

(C) 単離個体: alp

(ix) 特徴:

(A) 名称/キー: エキソン

(B) 位置: 2310..2634

(ix) 特徴:

(A) 名称/キー: エキソン

(B) 位置: 2684..3129

(ix) 特徴:

(A) 名称/キー: エキソン

(B) 位置 : 3188..3276

(ix) 特徴 :

(A) 名称 / キー : エキソン

(B) 位置 : 3333..3686

(xi) 配列記載 : 配列番号 3 :

GGATCCATAA TGAGCACACT TGAACCTCGC ATGAGTGCTC CATATCTTAG ATCCATTGA	60
GTCACGAGCG TCGAAGCCAA GGCTAAAAGA AAAGGGACCA AGACCGCCGC ATATCGGGGT	120
GGCTGAACAA TCGCTGCTAG TGTGTACACA GGATACATAA ATTAATCAAG AGCCAATGAC	180
GTTATCGAAG ACATGATATT ACTTACTTGA TTTGTTGCGG TGCTCCGACT CAACTGGATT	240
CAGATGGAAG GGAAGGGATT CTTGATCAGG CTCGTCCCGG GATGACCATT GCTCCTCTCG	300
AATCGAGACA ATGTTGAATG OCCAGGATGA CGATTGAGAG CGAGATATTA AAAAAGAGAT	360
TAAGGGTTGA CGATTGCCAA CGGAAGCCCG ATGGAAGAAG AAATGCCAAG AATTTGGCTG	420
CCTGGATGTT AGTGCCGTTT AGCCTCAGGC CCCAGCTGAA TCCCTGCCAA TCACGAGGCA	480
GGGCTCACCA CCTCCAACCC TTACACAAGA CTCGCCCTCG CTCTTTCCTG CAGGTCTCT	540
GCTTACTTTC CCCTCTTTTC OCTCCTGAAA TGCCCCGAGA ATGCCGTCCG GAGCTTAGGA	600
AAGCTACGAC GGCTTAATGT TCTAATTTCC CCCACCGACC TGCCCTGGCC AGTTAGACCG	660
CCGGACCCAT CGAATGCAAC ATCACCAACA CTAATTTACC TGCATCTCTG TCAGCCCACT	720
GGGTTTAACT AGATATGCCA AGGACTTGCT TGGCTGGTTT ATGCATGAAG AGAGATGGGC	780
ACTAGTCCGT GCGGGACCAC AAACCTCAAC TGCAGAGGGC TCATGCACCT GAAAGACTGC	840
CAATGATCAT TTGACTGGTT AGGTCAAGGG GTTAGGCTTA GAGCCCTTTG CTAATGCCGA	900
TGCCGCCTCT TTGACTGCCA CATTTCTTGG CTTCCCTCT TGGCCCCCTCC CGTCCCTTGA	960
TGCCAAGGGC CTTGGTGGCT CGGACTCCCG GCGGTAGGCT GGCCACCTAC TCATGGCGTG	1020
CGGAGATGGG CCATTCAGGT TGTGCCTAAT GACATACTCT GATGCCGACG GGAAGGCCGG	1080
CTGCTTGCTG GTGTCATTGG CTTCTCGAAT GACTCGGAGG ATTGTCGTCT TGCAGGACTT	1140
TTGTGTAACA ACAGGGGCCG ACAGTTGGCG TGGCTGCCGT GGATATGCTT TTGCTGCGAG	1200
CCATGGTTAT TCTGCGGAAC GAAACCACCC TCCCACCCAA ACAGGGCTAA TGTGCCCAGG	1260
TCCTGATACC ATCAGAAGAC CTCCAGGAGC ACATGCCTGT TCGCATAACC GTGGTGTAGC	1320

ACCAGGAATT GCTTAGCTTA GCTTCTTCGA CTGGGGGGCC AGAAAGTGCT TATCGCAAAG	1380
ATCCCACTTC TTTGTGTGAT AGCCCCTCCC GCGGCCCTTG ATCAAGCCGT TCTCGCTCGC	1440
CCATACCGAA ACCGCGATAT TATAGGTGCA GATGGTTATT ATTCTTTTTC TTTTCTTTT	1500
TCTTTGCTTC TCATGCAGCC CCATACGTTG CCGAATTTGG CTACACCTTG GGGCTCATTC	1560
TTCGAAGTTT AGATTCCGAC AAGACCTCAG CACCCAATCA AAACCCCTGA TTCCTGATAA	1620
AAGACGTGGA AAAAAGCGGA TATCGCGTGA GGATGCCAAG CAAAGGGAAT GGGTCACATT	1680
GATCTCTGTC GCGCTGTTAG GATGATCTTC ACTCCTAAAG GCATCGCCGC GGCATTAGGC	1740
CCTTCCCTGT CCAAGATATC GGTTACTCCT CTCATTATGG CGAGCTACTT TGTGAATTAA	1800
TTGACTGAGG GATATACCAC CTTCCCTTTG AAGGTACCGA GCCACTACCT TGAGCGTTAG	1860
TTACTTTTTC GAGGAAAGCA TCCTATGCTA GTCTCTGCCA ATCACTGCAG CGTCGACAAC	1920
TTGCCATAGC CTTGTGTTCT TCACGGTCTA TCGGAACACC CGTTCATGAC TGAAAGGGGT	1980
CAGCGTCCGT GGTGGTCAAC ATCATTCTCA TCTTTCATCA TGCCCGCTGA TTGATAGAGT	2040
AATTTCCGGT GGAGCACAAC GCCGTCTCT GAGATGCAAT GTCACCCTGT AAGTTTCAAC	2100
TACAATCTGT AGTACAGAGC ATCCTTGTA TGGCATGCTG TGCAAGTGAT CCAAATCCGT	2160
AGAACTTGCT CGAGAACAGG GAAATATAGA ACTCCTGAAG GTTATAAATA CCACATGCAT	2220
CCCTCGTCCA TCCTCACTTC CATCATCAAG CCAGCGGTTT CTATCCTCCG ACTTGAGTTG	2280
TTCTTGCGCA TCTTTACAAT CTTCTCATCA TGCAGTCCAT CAAGCGTACC TTGCTOCTCC	2340
TCGGAGCTAT CCTTCCCGCG GTCCTCGGTG CCCCTGTGCA GGAAACCCGC CGGGCCGCTG	2400
AGAAGCTTCC TGGAAAGTAC ATTGTCACAT TCAAGCCCGG CATTGACGAG GCAAAGATTC	2460
AGGAGCATAC CACCTGGGCT ACCAACATTC ACCAGCGCAG TCTGGAGCGT CGTGGCGCCA	2520
CTGGCGGTGA TCTTCCTGTC GGTATTGAGC GCAACTACAA GATCAACAAG TTCGCCGCT	2580
ATGCAGGCTC TTTCGACGAT GCTACCATTG AGGAGATTCT CAAGAACGAA GATGTTTGTG	2640
GTCATCCGCT CGCATTTTTG AATGACAGCT AACTCGCGCC CAGGTTGCCT ACGTCGAGGA	2700
GGACCAGATC TACTACCTCG ATGGCCTGAC TACCCAGAAG AGTGCCCCCT GGGGTCTGGG	2760
CAGCATTTCC CACAAGGGCC AGCAGAGCAC CGACTACATC TACGACACTA GTGCCGGCGA	2820
GGGCACCTAT GCCTACGTGG TGGATAGCGG TGTCAATGTC GACCATGAGG AGTTCGAGGG	2880
CCGCGCCAGC AAGGCCTACA ACGCTGCCGG TGGTCAGCAT GTGGACAGCA TTGGCCATGG	2940

CACCCACGTT TCCGGCACCA TTGCTGGCAA GACTTATGGT ATCGCCAAGA AGGCCAGCAT	3000
OCTTTCGGTC AAAGTTTTCC AGGGTGAATC GAGCAGCACT TCCGTCATTC TTGACGGCTT	3060
CAACTGGGCT GCCAACGACA TTGTTAGCAA GAAGCGTACC AGCAAGGCTG CAATCAACAT	3120
GAGCTTGGGT GAGTTTACAT TGTTCTTCTC TACTTGGAAC GCGCGAGCGC TAATTTCAAA	3180
AACACAGGCG GTGGCTACTC TAAGGCTTTC AACGATGCGG TCGAGAACGC ATTCGAGCAG	3240
GGTGTTCTCT CGGTTGTCGC TGCCGGTAAC GAGAACGTAC GTCTCCCCTC CATCGCGCAA	3300
AGACGAATTC GTAAGTACTG TGATTTTCTT AGTCTGATGC CGGCCAAACC AGCCCTGCCT	3360
CTGCCCCCTGA TGCCATCACT GTTGCCGCTA TCCAGAAGAG CAACAACCGC GCCAGTTTCT	3420
CCAAC TTTGG CAAGGTCGTT GACGTCTTCG CTCCCGGTCA AGATATCCTT TCTGCCTGGA	3480
TTGGCTCTTC CTCTGCCACC AACACCATCT CTGGTACCTC CATGGCTACT CCCCACATTG	3540
TCGGCCTGTC CCTCTACCTC GCTGCCCTTG AGAACCTCGA TGGCCCCGCT GCCGTGACCA	3600
AGCGCATCAA GGAGTTGGCC ACCAAGGACG TCGTCAAGGA TGTTAAGGGC AGCCCTAACC	3660
TGCTTGCCCTA CAACGGTAAC GCTTAAGTAC CAGGAGTACG TCGCAGGATT CTACCATTGT	3720
TACTGGAATA CAATGATGAT TAGAAAACGA AGAGCGTTAT GATTTCGGACG GATATATGCA	3780
TGGCACCCAT ACAGCGTGAT ACATAGGCTG TTTGCTCAAG AATTAGGATT TTATCTGAAT	3840
CCATGTACAG AGTATACTTA TGTTAGTAGT CAATAAAATC TTGGCTTTCT AATTTTGTCC	3900
CATCTACAAG GGGTCGTCGA TC	3922

(2) 配列番号4の情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 36塩基対

(B) 型: 核酸

(C) スtrand: 1本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(ii) 分子型: cDNA

(xi) 配列記載: 配列番号4:

CCCTCGGGCT CGGACCCCGC CTTCTCGCA GCCCAAG

(2) 配列番号5の情報:

## (i) 配列特性：

(A) 長さ：41塩基対

(B) 型：核酸

(C) スtrand：1 本鎖

(D) トポロジー：直鎖

(ii) 分子型：cDNA

(xi) 配列記載：配列番号 5：

COCTCGTTTCG TCAGGCCCGC GTCCAGCACG GACTTGGGCT G

## (2) 配列番号 6 の情報：

## (i) 配列特性：

(A) 長さ：1029塩基対

(B) 型：核酸

(C) スtrand：1 本鎖

(D) トポロジー：直鎖

(ii) 分子型：cDNA

(vi) 起源：

(A) 生物：Candida antarctica

(C) 単離体：clb

(xi) 配列記載：配列番号 6：

ATGAAGCTAC TCTCTCTGAC CGGTGTGGCT GGTGTGCTTG CGACTTGCGT TGCAGCCACT	60
OCTTTGGTGA AGCGTCTACC TTCCGGTTCG GACCCTGCCT TTTCGCAGCC CAAGTCGGTG	120
CTCGATGCCG GTCTGACCTG CCAGGGTGCT TCGCCATCCT CGGTCTCCAA ACCCATCCTT	180
CTCGTCCCCG GAAOCGGCAC CACAGGTCCA CAGTCGTTTC ACTCGAACTG GATCCCCCTC	240
TCAACGCAGT TGGGTTACAC ACCCTGCTGG ATCTCACCCC CGCCGTTCAT GCTCAACGAC	300
ACCCAGGTCA ACACGGAGTA CATGGTCAAC GCCATCACCG CGCTCTACGC TGGTTCGGGC	360
AACAACAAGC TTCOCGTGCT TACCTGGTCC CAGGGTGGTC TGGTTGCACA GTGGGGTCTG	420
ACCTTCTTCC CCAGTATCAG GTCCAAGGTC GATCGACTTA TGGCCTTTGC GCCCGACTAC	480



AAGGGCAACG TCCTCGCCGG CCTCTCGAT GCACTCGCGG TTAGTGCACC CTCCGTATGG	540
CAGCAAACCA CCGGTTTCGGC ACTCACCACC GCACTCCGAA ACGCAGGTGG TCTGACCCAG	600
ATCGTGCCCA CCACCAACCT CTACTCGGCG ACCGACGAGA TCGTTCAGCC TCAGGTGTCC	660
AACTCGCCAC TCGACTCATC CTACCTCTTC AACGGAAAGA ACGTCCAGGC ACAGGCCGTG	720
TGTGGGCCGC TGTTCGTCAT CGACCATGCA GGCTCGCTCA CCTCGCAGTT CTCCTACGTC	780
GTCGGTCGAT CCGCCCTGCG CTCCACCACG GGCCAGGCTC GTAGTGCAGA CTATGGCATT	840
ACGGACTGCA ACCCTCTTCC CGCCAATGAT CTGACTCCCG AGCAAAAGGT CGCCGCGGCT	900
GCGCTCCTGG CGCCGGCAGC TGCAGCCATC GTGGCGGGTC CAAAGCAGAA CTGCGAGCCC	960
GACCTCATGC CCTACGCCCG CCCCTTTGCA GTAGGCAAAA GGACCTGCTC CGGCATCGTC	1020
ACCCCTGA	1029

【図1】

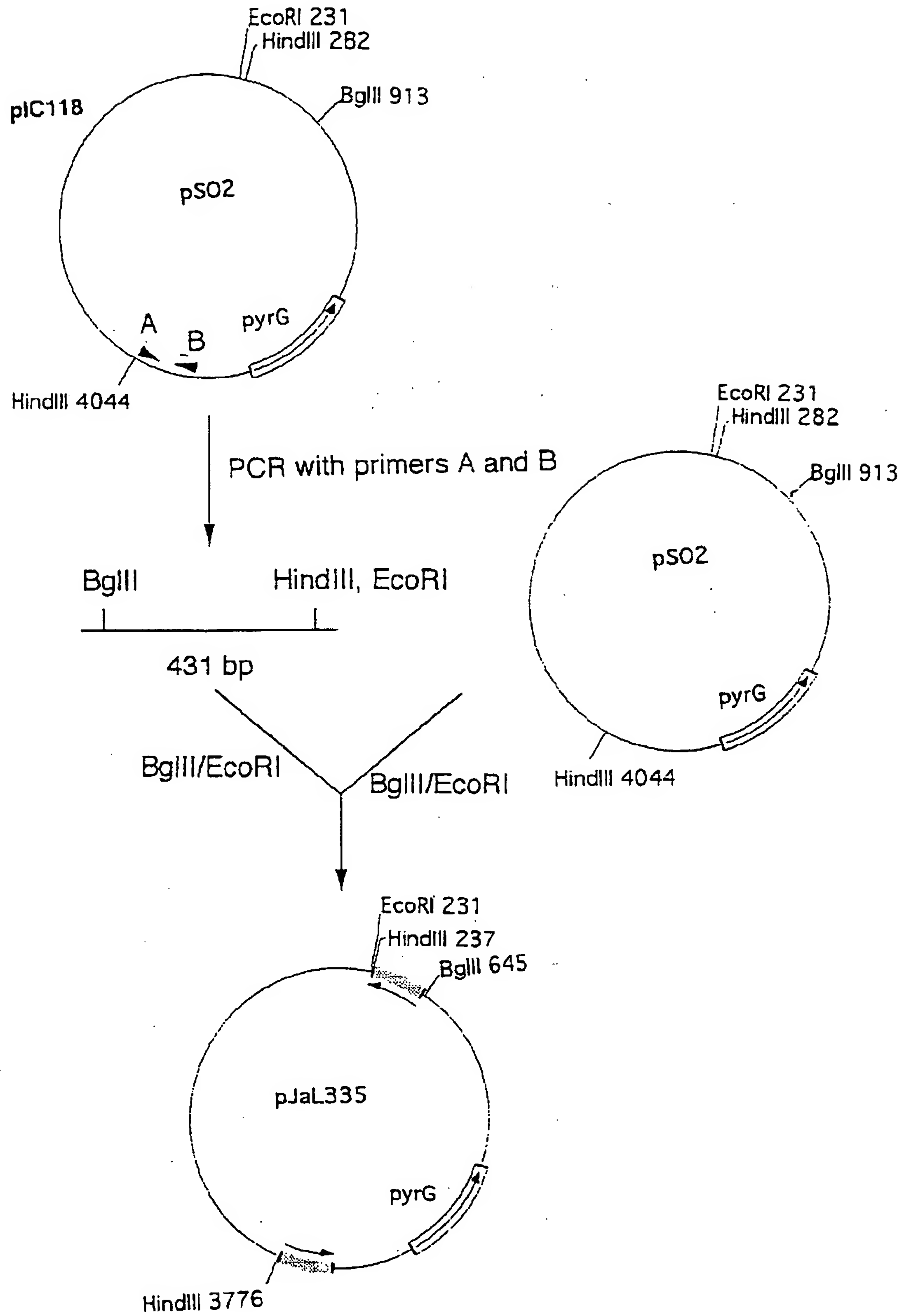


Fig. 1

【図2】

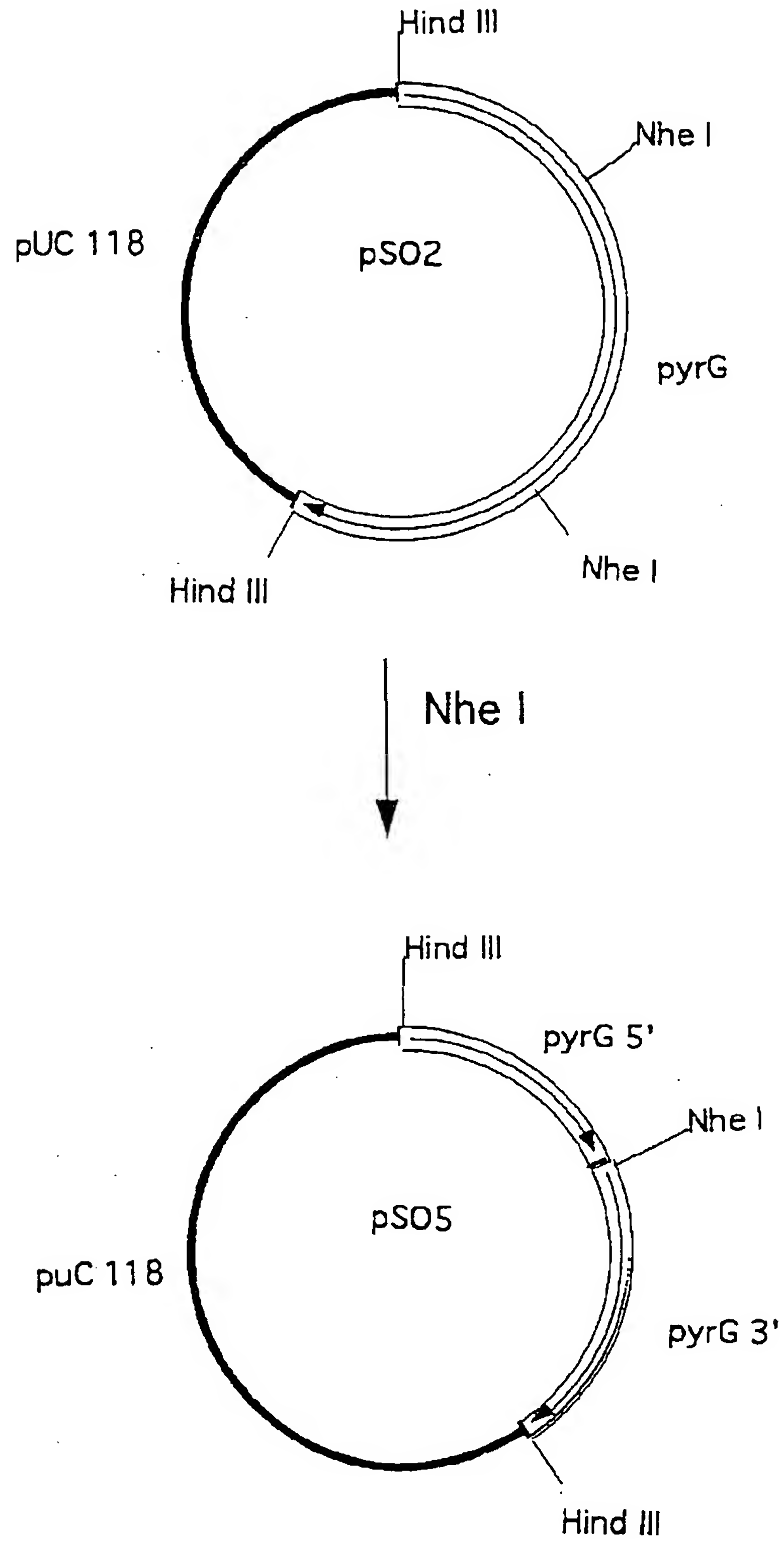


Fig. 2

【図3】

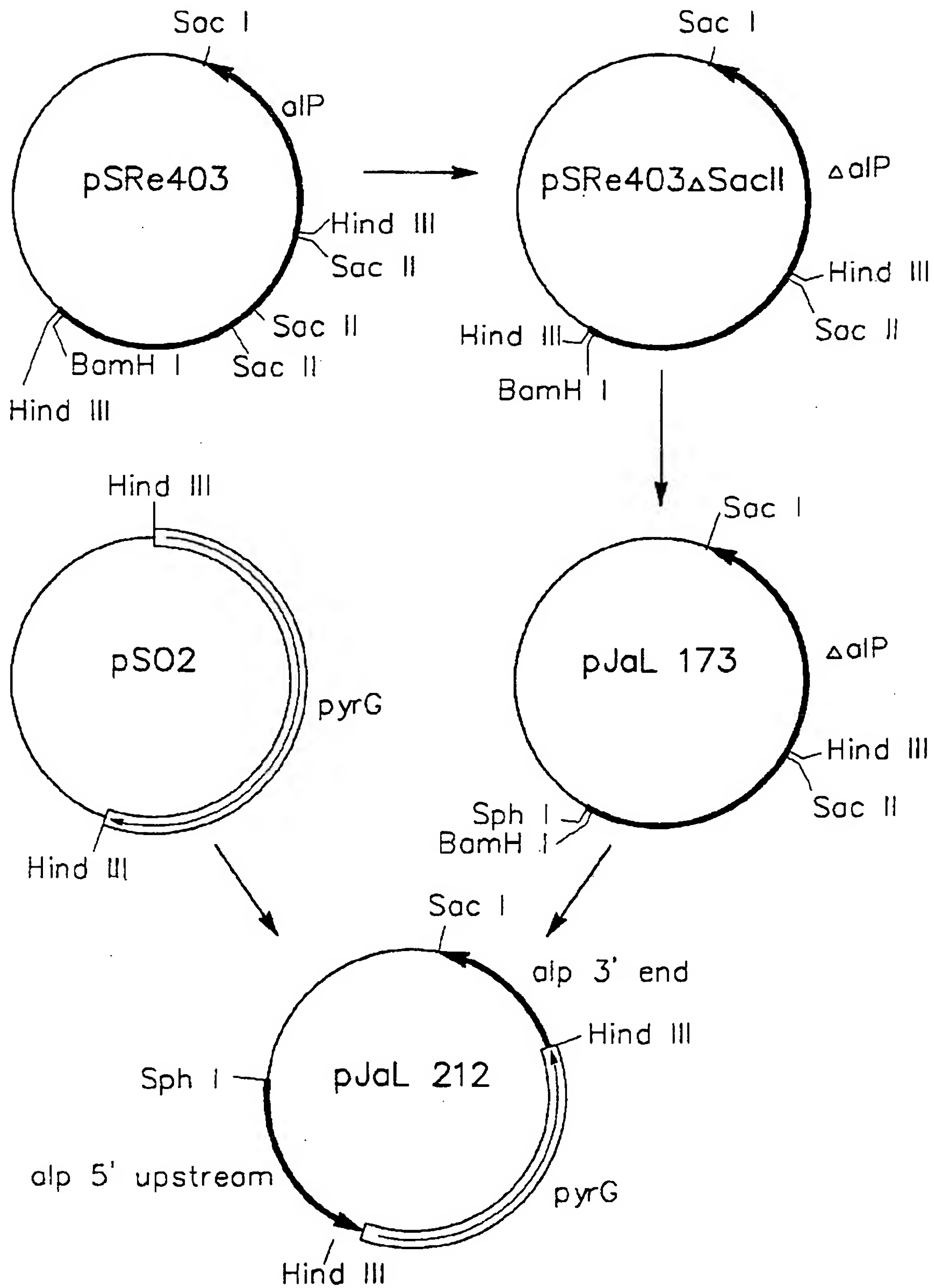


Fig. 3

【図4】

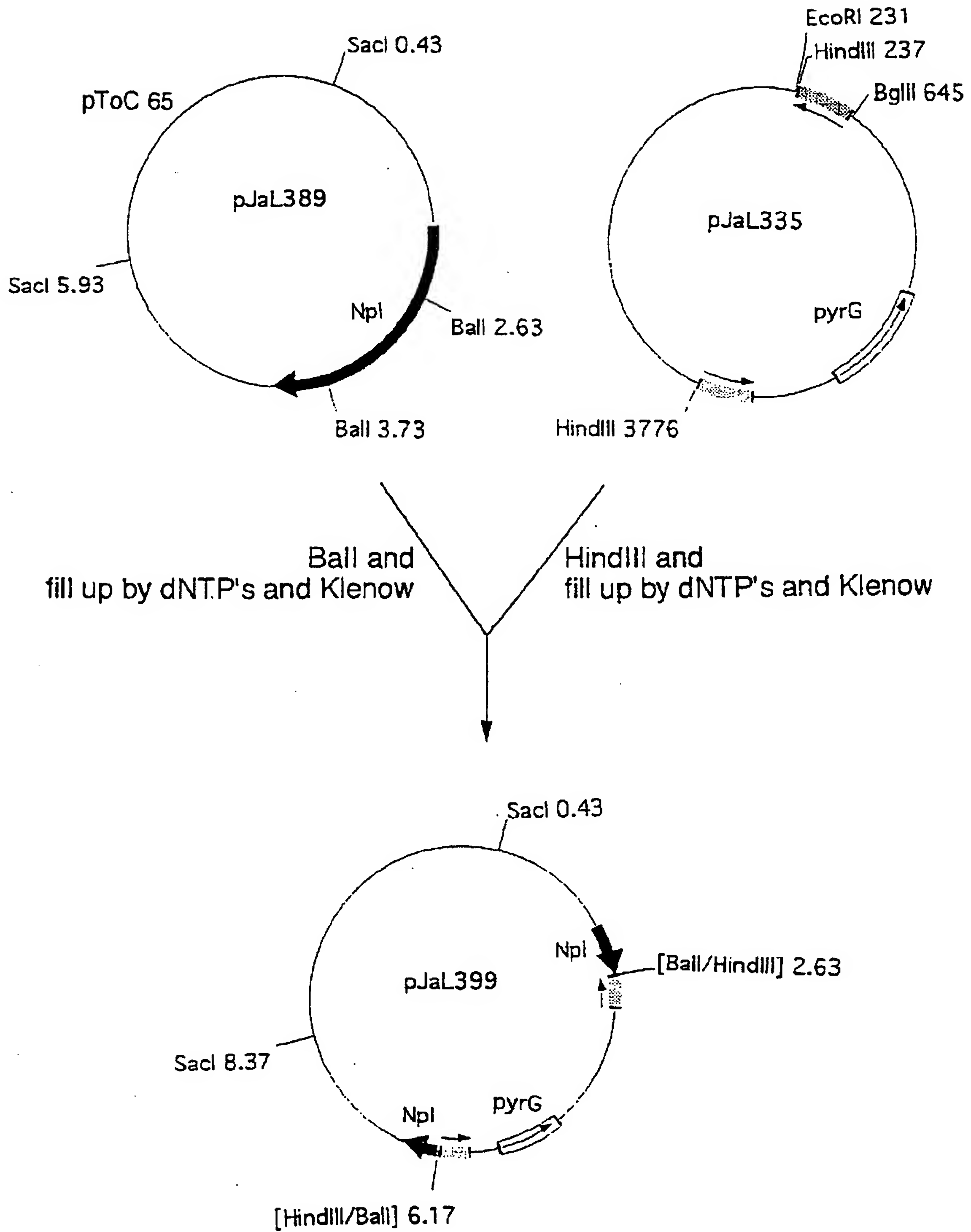


Fig. 4



【図5】

C.アンタークチカリパーゼBのN末端アミノ酸配列

L P S G S D P A F S Q P K S V L D A G L T N E G

NOR930

NOR929

NOR929

CCCTCGGGCTCGGACCCCGCCTTCTCGCAGCCCAAG

G  
G G T

NOR930

CCCTCGTTCGTCAGGCCCGCGTCCAGCACCGACTTGGGCTG

G G G G

Fig. 5

【図6】

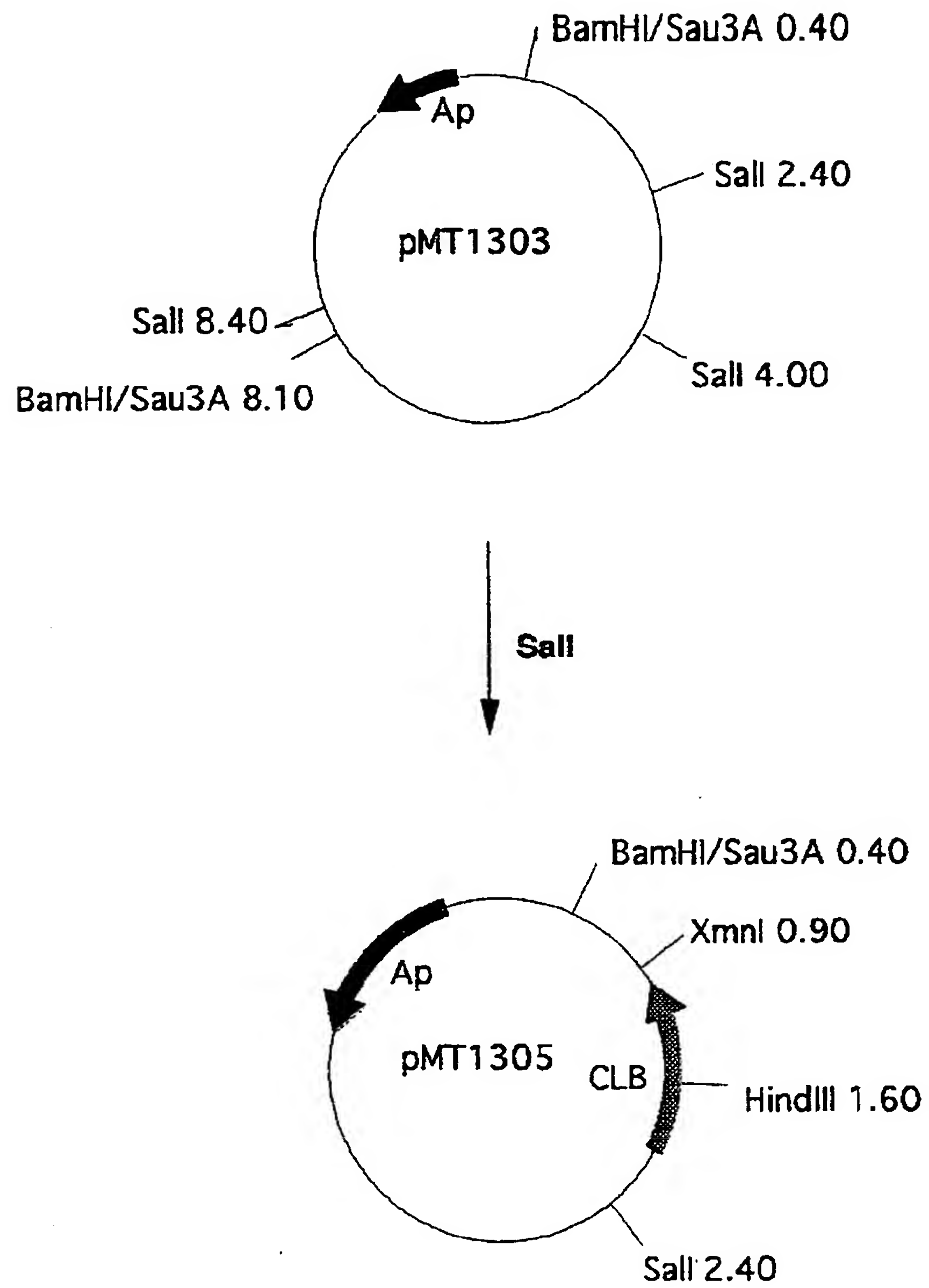


Fig. 6

【図7】

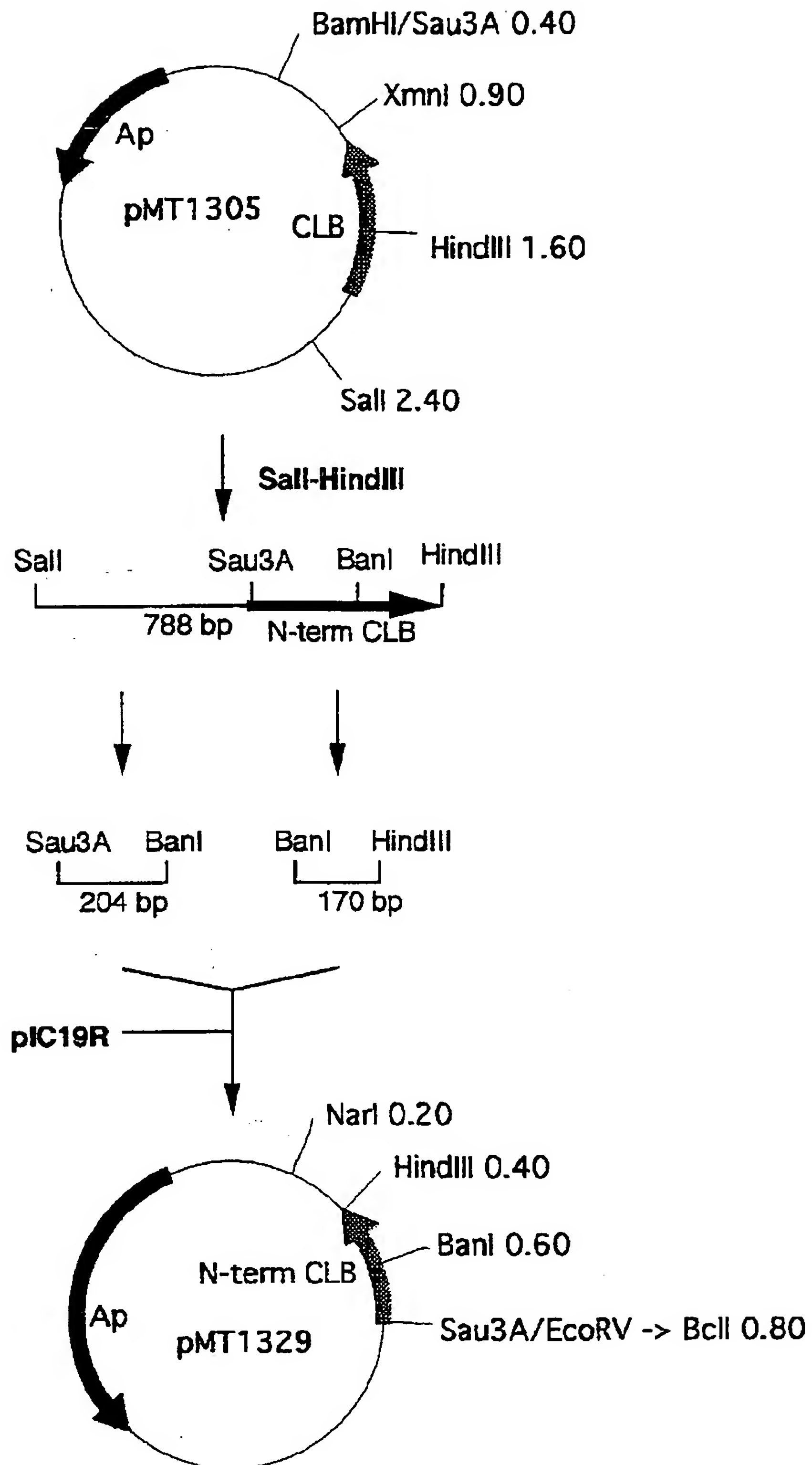


Fig. 7

**Fig. 8**

【図9】

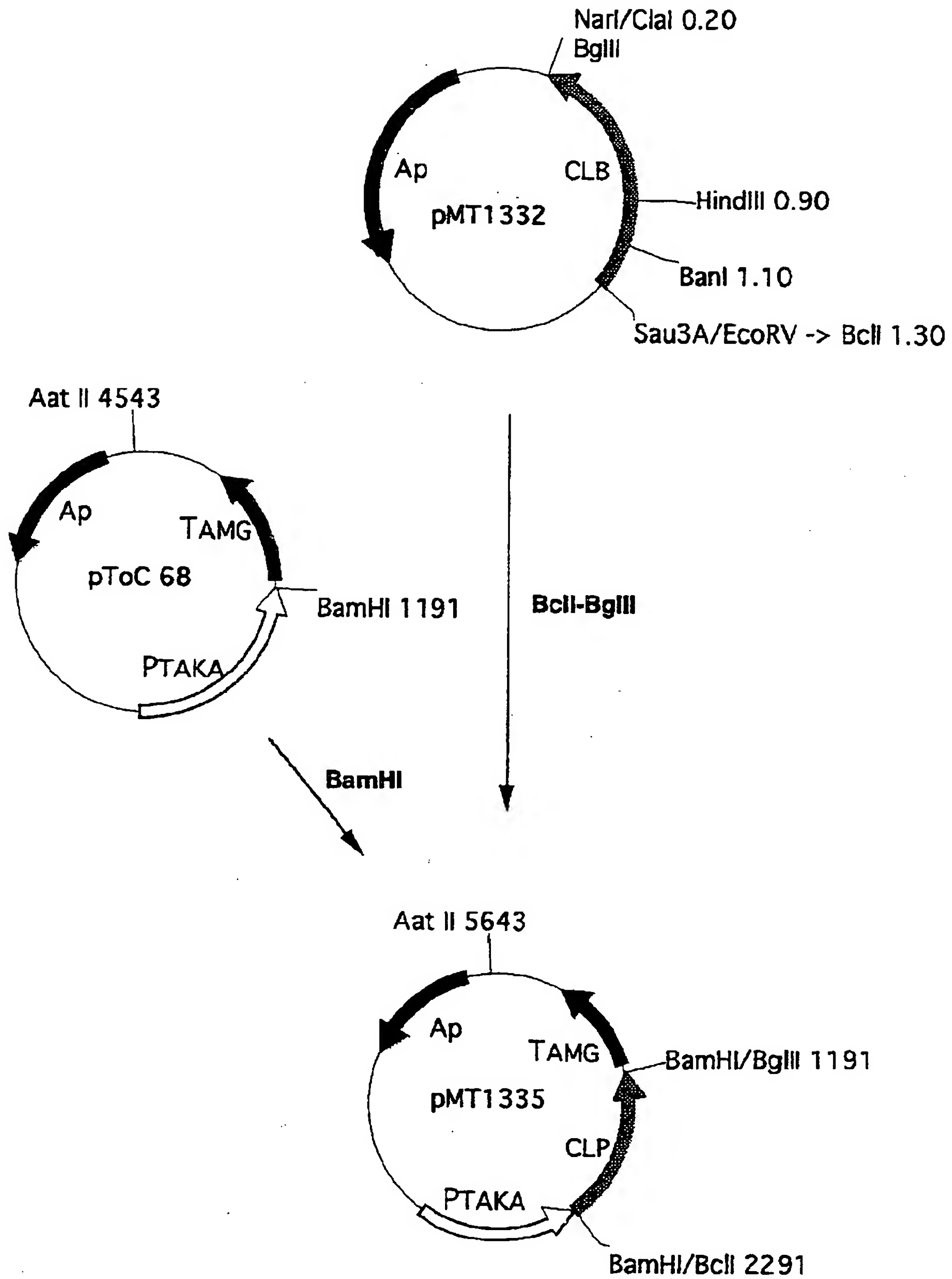


Fig. 9

【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】平成10年10月16日(1998. 10. 16)

【補正内容】

請求の範囲

1. 異種性タンパク質生産物の発現に有用な糸状真菌細胞であって、配列番号1の配列、またはこれに少なくとも70%同一なDNA配列、あるいは配列番号2の配列、またはこれに少なくとも70%同一なDNA配列によってコードされている内在性メタロプロテアーゼ、および、配列番号3の配列、またはこれに少なくとも70%同一なDNA配列によってコードされている内在性アルカリ性プロテアーゼが、機能的に不活性化されるか、または低下したレベルで発現される様に、組換えDNA技術によって修飾されている前記細胞。

2. 前記細胞が、アクレモニウム (*Acremonium*)、アスペルギルス (*Aspergillus*)、カンジダ (*Candida*)、コクリオボラス (*Cocliobolus*)、エンドシア (*Endothia*)、フサリウム (*Fusarium*)、ヒュミコラ (*Humicola*)、ニューロスボラ (*Neurospora*)、リゾムコール (*Rhizomucor*)、リゾプス (*Rhizopus*)、サーモミセス (*Thermomyces*)、トリコデルマ (*Trichoderma*)、ポドスポラ (*Podospora*)、ピリクラリア (*Pyricularia*)、およびペニシリウム (*Penicillium*) 属の群中から選択される菌株である、請求項1の糸状真菌細胞。

3. 前記菌株が、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・フェニキス (*Aspergillus phoenicis*)、アスペルギルス・ジャポニカス (*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・フィータス (*Aspergillus foetus*)、フサリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*)、フサリウム・ソラニ (*Fusarium solani*)、ヒュミコラ・グリセア (*Humicola grisea*)、ニューロスボラ・クラサ (*Neurospora crassa*)、ペニシリウム・クリソゲナム (*Penicillium chrysogenum*)、リゾムコール・メイヘイ (*Rhizomucor meihai*)、

トリコデルマ・レセイ (*Trichoderma reesei*)、およびトリコデルマ・ビリデ (*Trichoderma viride*) の群中から選択される、請求項2の細胞。



4. 前記菌株が、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*), アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) および ATCC20334 で同定されるフサリウム属の種の群中から選択される、請求項2の細胞。

5. 前記メタロプロテアーゼが、フサリウム属のメタロプロテアーゼである、請求項1の細胞。

6. 前記メタロプロテアーゼが、フサリウム・オキシスポラムのメタロプロテアーゼである、請求項5の細胞。

7. 前記メタロプロテアーゼが、配列番号1のヌクレオチド配列、またはこれに少なくとも70%同一なDNA配列を有する、請求項5または6の細胞。

8. 前記メタロプロテアーゼが、pH約6-8の範囲内で、至適タンパク質分解活性を示す中性メタロプロテアーゼである、請求項5-7の任意の1項の細胞。

9. 前記メタロプロテアーゼが、アスペルギルス属のNpIまたはNpII類の中性メタロプロテアーゼである、請求項8の細胞。

10. 前記メタロプロテアーゼが、配列番号2のヌクレオチド配列、またはこれに少なくとも70%同一なDNA配列に由来するアミノ酸配列を有するアスペルギルス・オリゼの中性メタロプロテアーゼIである、請求項9の細胞。

11. 前記アルカリ性プロテアーゼが、アスペルギルス属のアルカリ性プロテアーゼである、請求項1の細胞。

12. 前記アルカリ性プロテアーゼが、配列番号3のヌクレオチド配列、またはこれに少なくとも70%同一なDNA配列を含んでいるcDNA配列によってコードされている、請求項11の細胞。

13. 前記メタロプロテアーゼをコードする配列またはその制御配列、および前記アルカリ性プロテアーゼをコードする配列またはその制御配列内において、組換えDNA技術によって遺伝的に修飾されている、請求項1-12の任意の1項の細胞。

14. 前記技術が、特異的またはランダム突然変異、PCRによる突然変異、部位特異的DNAの欠失、挿入および／または置換、遺伝子破壊または遺伝子置換、アンチセンス法、あるいはこれらの組み合わせである、請求項13の細胞。

15. メタロプロテアーゼのレベルが、約50%より大きく、好ましくは約85%より大きく、好ましくは約90%より大きく、最も好ましくは約95%より大きく低下している、請求項1-14の任意の1項の細胞。

16. アルカリ性プロテアーゼ活性のレベルが、約50%より大きく、好ましくは約85%より大きく、好ましくは約90%より大きく、最も好ましくは約95%より大きく低下している、請求項1-15の任意の1項の細胞。

17. メタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼ活性の低下が、請求項15または16に示された低下の任意の組み合わせである、請求項1-14の任意の1項の細胞。

18. 前記細胞が、本質的に任意のメタロプロテアーゼおよびアルカリ性プロテアーゼ活性を含まない、請求項1-17の任意の1項の細胞。

19. メタロプロテアーゼ活性およびアルカリ性プロテアーゼ活性の発現を低下させるか、または除く様に、前記細胞を組換えDNA技術によって遺伝的に修飾する、請求項1-18の任意の1項の細胞を生産する方法。

20. 前記メタロプロテアーゼをコードする配列またはその制御配列、および前記アルカリ性プロテアーゼをコードする配列またはその制御配列内において、前記細胞を、組換えDNA技術によって遺伝的に修飾する、請求項19の方法。

21. 請求項1-18の任意の1項の細胞において、異種性タンパク質生産物を生産する方法であって、

(a) 前記タンパク質生産物をコードする核酸配列を、前記細胞内に導入する工程；

(b) 適当な増殖培地中で、工程(a)の細胞を培養する工程；

(c) 前記タンパク質生産物を単離する工程；

を含んでいる前記方法。

22. 前記タンパク質生産物が、治療活性のある遺伝子産物、例えばインスリン、成長ホルモン、グルカゴン、ソマトスタチン、インターフェロン、EPO、TP0、PDGF、第VII因子、第VIII因子、ウロキナーゼ、キモシンまたは組織プラスミノゲンアクチベーターまたは血清アルブミンである、請求項21の方法。

23. 前記タンパク質生産物が、真菌由来のタンパク質である、請求項21の方法
- 。
24. 前記タンパク質生産物が、真菌の酵素、特にデンプン分解酵素、例えば $\alpha$ アミラーゼ、 $\beta$ アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 $\beta$ ガラクトシダーゼ、セルロース分解酵素、脂質分解酵素、キシラン分解酵素、タンパク質分解酵素、酸化還元酵素、例えばペルオキシダーゼまたはラッカーゼ、ペクチナーゼ、あるいはクチナーゼである、請求項23の方法。
25. 前記タンパク質生産物が、細菌由来のタンパク質である、請求項21の方法
- 。
26. 前記タンパク質生産物が、前駆体タンパク質、すなわちチモ
- ーゲン、ハイブリッドタンパク質、プロ配列またはプレプロ配列として得られるタンパク質、あるいは任意の他の未成熟な型のタンパク質である、請求項21-25の任意の1項の方法。

【国際調査報告】

## SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

International application No.

PCT/DK 97/00397

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC6: C12N 1/19, C12N 1/15, C12N 15/80, C12N 15/81  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6: C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, EMBL/SWISSPROT/PIR/GENESEQ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 9629391 A1 (NOVO NORDISK A/S), 26 Sept 1996 (26.09.96), see page 6, lines 13-14 and the claims --	1-30
X	WO 8904866 A1 (CELLTECH LIMITED), 1 June 1989 (01.06.89), see page 1, lines 27-33; page 2, lines 20-22; page 17, line 12-14 and the claims --	1-30
X	WO 9217595 A1 (THE SALK INSTITUTE BIOTECHNOLOGY/INDUSTRIAL ASSOCIATES, INC.), 15 October 1992 (15.10.92), page 1, line 24 - page 2, line 3; page 7, line 11 --	1-30

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 December 1997

Date of mailing of the international search report

09-01-1998

Name and mailing address of the ISA/  
Swedish Patent Office  
Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM  
Facsimile No. +46 8 666 02 86

Authorized officer

Carolina Palmcrantz  
Telephone No. +46 8 782 25 00

## SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

International application No.

PCT/DK 97/00397

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0327797 A1 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH), 16 August 1989 (16.08.89), see the claims  --	1-30
X	Molecular Microbiology, Volume 14, No 5, 1994, Katia Jatou-Ogay et al, "Cloning and disruption of the gene encoding an extracellular metalloprotease of Aspergillus fumigatus" page 917 - page 928  -- -----	1-30

## SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

International application No.

PCT/DK 97/00397

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9629391 A1	26/09/96	AU 4940096 A	08/10/96
WO 8904866 A1	01/06/89	AU 2727388 A	14/06/89
		DK 367689 A	27/09/89
		EP 0351427 A	24/01/90
		JP 2502247 T	26/07/90
WO 9217595 A1	15/10/92	AU 661844 B	10/08/95
		AU 1750592 A	02/11/92
		AU 3660095 A	11/01/96
		CA 2105064 A	02/10/92
		EP 0578746 A	19/01/94
		JP 6506117 T	14/07/94
		US 5324660 A	28/06/94
		US 5541112 A	30/07/96
EP 0327797 A1	16/08/89	DE 3804890 A,C	13/07/89
		JP 2002385 A	08/01/90
		US 5179003 A	12/01/93



## フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**